

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Miwako OSAKI et al. **Mail Stop PCT**
Appl. No: : Not Yet Assigned PCT Branch
I. A. Filed : April 22, 2004
(U.S. National Phase of PCT/JP2004/005818)
For : CELL STIMULATING DEVICE AND CELL STIMULATING METHOD

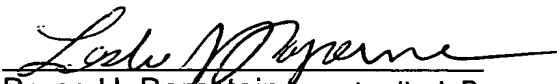
CLAIM OF PRIORITY

Commissioner for Patents
U.S. Patent and Trademark Office
Customer Service Window, Mail Stop PCT
Randolph Building
401 Dulany Street
Alexandria, VA 22314

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 and 365 based upon Japanese Application No. 2003-116895, filed April 22, 2003. The International Bureau already should have sent a certified copy of the Japanese application to the United States designated office. If the certified copy has not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,
Miwako OSAKI et al.


Bruce H. Bernstein Leslie J. Paperner
Reg. No. 29,027 Reg. No. 33,329

October 18, 2005
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1950 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

BEST AVAILABLE COPY

10/18/05

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

22. 4. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 4月22日
Date of Application:

REC'D 01 JUL 2004

WIPO

PCT

出願番号 特願2003-116895
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2003-116895]

出願人 独立行政法人理化学研究所
Applicant(s): 財団法人 東京都医学研究機構

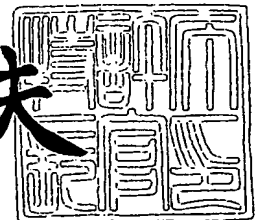
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 6月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 A11457A

【提出日】 平成15年 4月22日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所内

 【氏名】 尾崎 美和子

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都練馬区桜台 1 丁目 3 8 番 1 号

 【氏名】 伊藤 康一

【特許出願人】

 【識別番号】 000006792

 【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

 【識別番号】 591063394

 【氏名又は名称】 財団法人 東京都医学研究機構

【代理人】

 【識別番号】 110000109

 【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

 【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 170347

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

 【包括委任状番号】 0205404

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞刺激装置及び細胞刺激方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 培養細胞を入れるための培養容器の一方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち一方の第一の電極と、前記培養容器の他方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち他方の第二の電極とを備え、前記第一の電極と前記第二の電極とにより細胞を刺激する電場を形成することを特徴とする、細胞刺激装置。

【請求項 2】 培養細胞を入れるための培養容器の上面又は側面の一方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち一方の第一の電極と、前記培養容器の上面又は側面の他方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち他方の第二の電極とを備え、前記第一の電極と前記第二の電極とにより細胞を刺激する電場を形成することを特徴とする、請求項 1 に記載の細胞刺激装置。

【請求項 3】 前記第一の電極が円形のリング電極である、請求項 1 又は 2 に記載の細胞刺激装置。

【請求項 4】 前記第二の電極が一本の点電極である、請求項 1 から 3 の何れかに記載の細胞刺激装置。

【請求項 5】 前記第二の電極が複数の多点電極である、請求項 1 から 3 の何れかに記載の細胞刺激装置。

【請求項 6】 前記第二の電極がメッシュ状のシート状電極である、請求項 1 から 3 の何れかに記載の細胞刺激装置。

【請求項 7】 前記第二の電極が多点電極を含むシート状電極である、請求項 1 から 3 の何れかに記載の細胞刺激装置。

【請求項 8】 請求項 1 から 7 の何れかに記載の細胞刺激装置を用いて、前記第一の電極と前記第二の電極とにより電場を形成し、該電場により培養細胞を刺激することを特徴とする、細胞の電氣的刺激方法。

【請求項 9】 培養細胞が神経細胞である、請求項 8 に記載の細胞の電氣的

刺激方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞刺激装置及び細胞刺激方法に関するものである。より詳細には、本発明は、培養細胞に非接触又は表面に軽く接触する程度の状態で該培養細胞に電氣的刺激を与えることができる細胞刺激装置及び細胞刺激方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

神経細胞の特徴の一つは、細胞自体が神経活動と呼ばれる電氣的な活動を有することである。未熟な神経細胞が分化・発達していく過程において、神経細胞は神経伝達物質や神経栄養因子などの刺激に反応してイオンチャンネルや伝達物質受容体などを発現し、神経細胞固有の伝達物質感受性や興奮性（固有の神経活動）を獲得していき、そのパターンが神経細胞の個々の歴史や個性を表現していると考えられる。また、近年ではこの神経活動、即ち電氣的な刺激が逆に神経に関連する物質の動態を制御していることも明らかとなってきた。

【0003】

本発明者らはこれまで、神経活動とその生物学的役割を明らかにするために研究を行ってきた。その結果、神経活動のパターン（電氣的活動のパターン）が情報コードシステムとして働いている可能性があることが明らかになってきた。本発明者らの研究の最終的な目標は、神経活動のパターンを制御することにより脳の可塑性を制御することであるが、そのために重要なことは、神経活動（神経インパルス）のパターンの持つ役割を明らかにし、神経活動のパターンを解読し、神経活動のパターンのプロファイリングを行うことである。そのためには、人為的によくコントロールされた刺激条件下で実験を行うことが必要であった。

【0004】

また、神経細胞の電氣的な活動を制御することにより、脳の可塑性を制御し、治療に応用することも可能である。再生医療においても、特に神経の再生におい

ては、神経細胞の電氣的な活動を持たせることが正常な機能を獲得する上で必須と考えられている。そのためには、生体外で効率よく大量の神経細胞に細胞を傷つけることなく、直接電気刺激を与えるための電気刺激装置が必須であった。

【0005】

細胞に電気刺激を与えるための従来の方法としては、(1) 電極を神経細胞に挿入することにより刺激する方法、または(2) 刺激用電極基盤上に神経細胞を接着させることにより刺激する方法が知られている。しかし、上記(1)の方法では、一度に多数の細胞を刺激することが困難であり、また細胞へのダメージも大きいという欠点がある。また、上記(2)の方法では、電極基盤上に接着できる神経細胞は極めて少なく、実用的な刺激装置として機能させることは困難であるという欠点がある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は上記した従来技術の問題点を解消することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、生体外で効率よく大量の神経細胞に、細胞を傷つけることなく、直接電気刺激を与えるための電気刺激装置を提供することを解決すべき課題とした。本発明はまた、生体外で効率よく大量の神経細胞に、細胞を傷つけることなく、直接電気刺激を与えることができる細胞刺激方法を提供することを解決すべき課題とした。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、培養細胞を入れるための培養容器の一方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち一方の第一の電極と、前記培養容器の他方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち他方の第二の電極とを備えた細胞刺激を用いて、前記第一の電極と前記第二の電極とにより電場を形成して、該電場により細胞を刺激することにより、細胞に所望の電氣的刺激を与えることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

即ち、本発明によれば、培養細胞を入れるための培養容器の一方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち一方の第一の電極と、前記培養容器の他方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち他方の第二の電極とを備え、前記第一の電極と前記第二の電極とにより細胞を刺激する電場を形成することを特徴とする、細胞刺激装置が提供される。

【0009】

好ましくは、培養細胞を入れるための培養容器の上面又は側面の一方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち一方の第一の電極と、前記培養容器の上面又は側面の他方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち他方の第二の電極とを備え、前記第一の電極と前記第二の電極とにより細胞を刺激する電場を形成することを特徴とする、上記の細胞刺激装置が提供される。

【0010】

好ましくは、前記第一の電極は、円形のリング電極である。

好ましくは、前記第二の電極は、一本の点電極であるか、複数の多点電極であるか、メッシュ状のシート状電極であるか、あるいは多点電極を含むシート状電極である。

【0011】

本発明の別の側面によれば、前記の何れかの細胞刺激装置を用いて、前記第一の電極と前記第二の電極とにより電場を形成し、該電場により培養細胞を刺激することを特徴とする、細胞の電氣的刺激方法が提供される。

好ましくは、本発明の細胞の電氣的刺激方法で刺激する培養細胞は神経細胞である。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明の細胞刺激装置は、培養細胞を入れるための培養容器の一方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち一

方の第一の電極と、前記培養容器の他方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち他方の第二の電極とを備え、前記第一の電極と前記第二の電極とにより細胞を刺激する電場を形成することを特徴とするものである。

【0013】

上記した第一の電極及び第二の電極はそれぞれ正又は負の電極を構成し、両者を組み合わせて使用することにより、細胞を刺激するための電場が形成される。上記した第一の電極及び第二の電極はそれぞれ培養容器の上面又は側面から培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びるように設置されている。

【0014】

本発明の一例では、第一の電極は円形のリング電極とし、第二の電極を一本の点電極、複数の多点電極、メッシュ状のシート状電極、あるいは多点電極を含むシート状電極とすることができる。以下、上記したような本発明の各種の実施の形態を図面に基づいて説明する。

【0015】

図1は、本発明の第一の態様の細胞刺激装置を示すものであり、具体的には、第一の電極が円形のリング電極（小型）であり、第二の電極が一本の点電極である場合の細胞刺激装置を示す。図1の上段の図は側面図を示し、中段の図は斜視図を示し、それぞれ、正（又は負）の電極1（一本の点電極）と負（又は正）の電極2（円形のリング電極）とが、培養容器蓋部5の異なる位置から配線3により電源7に接続された状態で、培養容器本体4の底面上で培養している細胞6の表面に接触する地点まで延びている状態を示す。なお、電極1と電極2は片方が正の電極の場合は、他方が負の電極になるように選択される。図1の下段の図は、上面から見た電極1と電極2の位置関係を示す。

【0016】

図2は、本発明の第二の態様の細胞刺激装置を示すものであり、具体的には、第一の電極が円形のリング電極（大型）であり、第二の電極が一本の点電極である場合の細胞刺激装置を示す。図2の上段の図は側面図を示し、正（又は負）の

電極 1 (一本の点電極) と負 (又は正) の電極 2 (円形のリング電極) とが、培養容器蓋部 5 の異なる位置から配線 3 により電源 7 に接続された状態で、培養容器本体 4 の底面上で培養している細胞 6 の表面に接触する地点まで延びている状態を示す。なお、電極 1 と電極 2 は片方が正の電極の場合は、他方が負の電極になるように選択される。図 2 の下段の図は、上面から見た電極 1 と電極 2 の位置関係を示す。

【0017】

図 3 は、本発明の第三の態様の細胞刺激装置を示すものであり、具体的には、第一の電極が円形のリング電極 (大型) であり、第二の電極が複数の多点電極である場合の細胞刺激装置を示す。図 3 の上段の図は側面図を示し、正 (又は負) の複数の多点電極 1 と負 (又は正) の電極 2 (円形のリング電極) とが、培養容器蓋部 5 の異なる位置から配線 3 により電源 7 に接続された状態で、培養容器本体 4 の底面上で培養している細胞 6 の表面に接触する地点まで延びている状態を示す。なお、電極 1 と電極 2 は片方が正の電極の場合は、他方が負の電極になるように選択される。図 3 の下段の図は、上面から見た電極 1 と電極 2 の位置関係を示す。

【0018】

図 4 は、本発明の第四の態様の細胞刺激装置を示すものであり、具体的には、第一の電極が円形のリング電極であり、第二の電極がメッシュ状のシート状電極である場合の細胞刺激装置を示す。図 4 の上段の図は側面図を示し、正 (又は負) の電極 1 (メッシュ状のシート状電極) と負 (又は正) の電極 2 (円形のリング電極) とが、培養容器蓋部 5 から配線 3 により電源 7 に接続された状態で、培養容器本体 4 の底面上で培養している細胞 6 の表面に接触する地点まで延びている状態を示す。なお、電極 1 と電極 2 は片方が正の電極の場合は、他方が負の電極になるように選択される。図 4 の下段の図は、上面から見た電極 1 と電極 2 の位置関係を示す。第二の電極 1 においては、メッシュ状に形成された電極 2 が、全体としてはシートを形成している。

【0019】

図 5 は、本発明の第五の態様の細胞刺激装置を示すものであり、具体的には、

第一の電極が円形のリング電極であり、第二の電極が多点電極を含むシート状電極である場合の細胞刺激装置を示す。図5の上段の図は側面図を示し、正（又は負）の電極1（多点電極を含むシート状電極）と負（又は正）の電極2（円形のリング電極）とが、培養容器蓋部5から配線3により電源7に接続された状態で、培養容器本体4の底面上で培養している細胞6の表面に接触する地点まで延びている状態を示す。なお、電極1と電極2は片方が正の電極の場合は、他方が負の電極になるように選択される。図5の下段の図は、上面から見た電極1と電極2の位置関係を示す。第二の電極2においては、多数の電極（多点電極）1が全体としてはシートを形成している。

【0020】

図1～図5に構造を示す本発明の細胞刺激装置においては、培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正と負の電極の組み合わせにより培養容器中の培地内に電場を形成し、この電場により細胞を電氣的に刺激することができる。本発明においては、刺激する細胞の種類や性質、形成する電場の強さ、並びに電場を形成する領域などに応じて、上記した図1～図5に記載した構造を有する細胞刺激装置の中から最も適したものを適宜選択して使用することができる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に示すが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【0021】

【実施例】

実施例1：分泌型ニューレグリンを特異的に認識する抗体の作製

（1）抗原ハプテンペプチドの設計

タンパク質の限定分解反応を補足する抗ペプチド抗体を調製するためには、標的とする基質タンパク質の切断部位に関する情報が必要である。本実施例では分泌型ニューレグリンのC末端を含む短いペプチド（5merあるいは6mer）にシステイン残基を付加したペプチドを合成し、ハプテンとして用いた。具体的には、Cys-Glu-Leu-Tyr-Gln及びCys-Glu-Leu-Tyr-Gln-Lysの混合ペプチドを抗原として用いた。

【0022】

(2) 用いた試薬

- ・合成ハプテンペプチド
- ・KLH(keyhole limpet hemocyanin) in 50%グリセロール(約80%mg/ml) [Calbiochem社]
- ・DMFA (ジメチルホルムアルデヒド)
- ・MBS (m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル) [Pierce社]
- ・ゲル濾過カラム (ファルマシアPD-10)
- ・50mMリン酸ナトリウムバッファー (pH7.5)
- ・100mMリン酸ナトリウムバッファー (pH7.2)

【0023】

免疫

- ・フロイント完全アジュバント (FCA)
- ・フロイント不完全アジュバント (FIA)
- ・シリンジ・注射針など

【0024】

抗体のアフィニティー精製

- ・100mM HEPESバッファー (pH7.5)
- ・Affigel 10または15 [バイオラッド社]
- ・30%酢酸
- ・20%エタノール
- ・PBS
- ・50mMクエン酸バッファー (pH3.0)
- ・2Mトリスバッファー (pH9.5)
- ・20%グリセロール含Na-PBS

【0025】

(3) 抗原(ハプテン/キャリア複合体)の調製

- ① MBS/活性化KLHを調製する。KLH約40mg(0.5ml)を50mM リン酸ナトリウムバ

ッファー (pH7.5) 1.5ml に加え、スターラーを用いて攪拌する。次に、9.3mg の MBS を 0.38ml の DMFA に溶解したものを (用時調製)、これに加える。MBS 添加後、室温で 30 分攪拌する。その後、2,000rpm で 2 分程度遠心し、上清を以下で用いた。

【0026】

② MBS/活性化KLH をフリーの MBS から分離する。ファルマシア PD-10 カラムをを 50mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.5) 40~50ml で洗浄し、平衡化しておく。これに①の遠心上清 2ml を添加し、ゲルに浸潤した後に 0.5ml のバッファーを加える。浸潤し終わった時点で溶出液の回収を始め (最初の 2.5ml を prevoid として捨てる)、2ml の溶出液 (MBS/活性化KLH) を回収する。これで 4 回分のカップリングに使用することのできる標品が得られる。

【0027】

③ 合成ハプテンペプチドを活性化KLH にカップリングする。合成ペプチド 5mg 程度を 4.5ml の 100mM リン酸Naバッファー (pH7.2) に溶解し、攪拌する。この際、pH 試験紙を用いて溶液の pH が下がっていないことを確認する。これに、0.5ml の MBS/活性化KLH を加え、4℃ で一昼夜攪拌する。その後、透析する必要はない。これを免疫原として使用する。保存は -20℃ または -80℃ で行う。

【0028】

(4) 免疫

- ① ウサギを用いてポリクローナル抗体を調製した。まず、体重約 3kg のウサギに対して 1 次免疫を行う。抗原溶液 0.3ml に対して 0.6ml の FCA を加え、攪拌後、超音波処理 [Branson Sonifier 185 (bath type)、power 7~10、3 分程度] によってエマルジョンを調製する。これを、左右の背筋上に位置する皮下部分に 10ヶ所程度に分けて注射する。注射針は 18G あるいは 21G を用いる。
- ② 約 1 ヶ月後に 2 次免疫を行う。この場合は、0.3ml の抗原溶液に対して 0.6ml の FLA を用いて、同様にエマルジョンを調製する。左右の大腿筋に注射する。
- ③ 2 次免疫の 2 週間後と 4 週間後に、3 次免疫及び 4 次免疫を行う。この場合は、0.15ml の抗原溶液を 0.45ml の PBS で希釈し、①と同様に背中に皮下注射を行う。用いる注射針は 26G でよい。
- ④ 4 次免疫の約 1 週間後に、部分採血を行う。40~50ml 程度採血し抗体の生成状

態をチェックした後、アフィニティー精製を行う。良好であれば、約1ヶ月休ませて、2回ほど追加免疫を行って、全採血を行う。

【0029】

(5) 抗体のアフィニティー精製

① アフィニティーゲルを調製する。アフィニティー担体としてはAffigel 10または15を用いる。まず、ハプテンペプチド1~5mgを4mlの100mM HEPESバッファー (pH7.5) に溶解する。次に、1~2mlのAffigelをガラスフィルター上で吸引洗浄し (氷冷蒸留水10ml×2回)、直ちにペプチド溶液に加える。一昼夜4℃で回転攪拌した後、フリーのペプチドを除くために、再度ガラスフィルター上で吸引洗浄する。この場合は、十分量の蒸留水以外に30%酢酸や20%エタノールを用いて完全に洗浄し、最後にPBSで平衡化しておく。保存は冷蔵で行う。

【0030】

② 特異的抗体をアフィニティークラムに吸着させる。アフィニティーゲルをカラムに (内径5~10mm程度) に詰め、PBSで洗浄する。非働化血清10mlを同量のPBSで希釈し、フィルター (0.22または0.45 μ m) を通し、カラムに添加する。透過液を回収し、3~4回再添加を繰り返す (流速は1ml/分程度)。さらに、約50mlのPBSでカラムを洗浄する。

【0031】

③ 抗体を回収する。あらかじめ0.5mlの2Mトリスバッファー (pH9.5) を入れておいたチューブに、アフィニティーゲルから抗体を溶出させる。溶出は、5mlの50mMクエン酸バッファー (pH3.0) を1ml/分程度の速度で添加して行う。次に、溶出液を透析チューブに移し、20%グリセロール含Na-PBSに対して透析を行う (4℃、一昼夜)。抗体の定量は、280nmの吸収を計測して行う (1mg IgG/ml、 $A_{280}=1.4$)。通常、1~10mgの特異的IgGが回収される。保存は、分注後-80℃で行う。

【0032】

実施例2：ニューレグリンの病態作用機序

(方法)

(1) 細胞の調製

脳橋核の神経細胞および小脳顆粒細胞を各々 E18BALB/C および P7 マウスから標準法によって調製した。7 DIV (days in vitro) 培養物を、両方の細胞種における PMA 及び電気刺激のために使用した。顆粒細胞は、受容体サブユニット発現の定量のために、10 mM の KCl 条件下インビトロで 1~21 日間培養した。脳橋核ニューロンは、10% 馬血清を含む DMEM (Gibco BRL) で 1 又は 2 日間培養し、その後、B-27 (Gibco BRL) を補充した Neurobasal 培地 (Gibco BRL) で維持した。培養物には、B-27 (Gibco BRL) を補充した Neurobasal 培地 (Gibco BRL) から成る培地を供給した。GFP タグ及びベクターを含む全長の NRG プラスミド (pEGFP, Clontech) を Lipofectamine (登録商標) 2000 (Gibco BRL) により各々トランスフェクションした (脳橋核のトランスフェクション効率; 1~3%、顆粒細胞; 5~10%)。トランスフェクションの 24~36 時間後にニューロンを 1 μ M の PMA (Tocris) で 60 分間刺激した。

【0033】

(2) 切断型の NRG の検出

本実施例における電気刺激は、本明細書中上記した構造を有し、図 1 から 5 に示した構造を有する細胞刺激装置を用いて行った。

組み換え全長 mNRG をトランスフェクションした $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 細胞に 30 分間の電気刺激 (1 mA、30~60 V 細胞外) を加えた後、細胞から得られた条件培地を回収し、セントリコン 10 及び 100 (Millipore) を用いて濃縮し、大分子量 (>100 kD) 及び小分子量 (<10 kD) のタンパク質を除去した。7 DIV の顆粒細胞は、脳橋核ニューロン及び顆粒細胞から得た濃縮条件培地で処理した。ErbB リン酸化において、ポリクローナル抗-ErbB4 抗体 (Santa Cruz) による免疫沈降後に、マウスモノクローナル抗ホスホチロシン抗体 (4G10) を用いて標準法によりウエスタンブロット分析を行った (Rieff 他 J Neurosci, 19(24), 10757-10766(1999))。免疫沈降試験のために、ライセートを免疫沈降抗体の適当な希釈物と一緒に 4℃ で 1 時間インキュベートした後、プロテイン A-Sepharose と一緒に 4℃ で 1 時間インキュベートした。次いで、ライセートを 15000 rpm で 3 分間遠心し、上清を廃棄した。ペレットを溶解緩衝液で 2 回洗浄し、ゲルローディング緩衝液に再懸濁した。試料を 3 分

間煮沸し、タンパク質を電気泳動で分離した。

【0034】

CREBリン酸化を検出するために、7DIVの培養顆粒細胞を、条件培地で10～15分間刺激した後、4%パラホルムアルデヒドで10分間固定化し、ポリクローナル抗-NRG β 1抗体、ポリクローナル抗-PCREB抗体 (BioLabs) で染色した。染色した顆粒細胞をレーザー共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss) で観察した。Alexa (登録商標) 染料 (Molecular probe) を二次抗体として使用した。

【0035】

(結果)

(1) 脳橋核ニューロン及び小脳顆粒細胞におけるNRGの膜貫通型のタンパク質分断

図6Aの実験で使用した小脳顆粒細胞及び脳橋核ニューロンの分散初代培養物の状態を調べた。脳橋核ニューロン (PN) は、18日目の胚 (E18) から調製し、小脳顆粒細胞 (GC) は出生後7日目 (P7) から調製した。培養ニューロンでのmNRGのタンパク質分断の有無を調べるために、抗ErbB及び抗ホスホチロシン抗体による免疫沈降、及び抗PCREB抗体を用いた免疫細胞化学分析を、GFP-tagを含む組み換え全長NRG β 1をトランスフェクションした場合としない場合について、PKC活性化因子であるホルボール-12-ミリステート-13-アセテート (PMA) で60分間刺激した脳橋核ニューロン及び顆粒細胞を用いて行った。

【0036】

苔状線維と顆粒細胞の間のシナプスにおけるNRG受容体に関連して、ErbB2及びErbB4が小脳系に関与していることは既報である (Ozaki M 他 Nature, 390, 691-694(1997); 及びOzaki M 他 Neurosci Res, 30 (4), 351-354(1998))。ErbB4の発現は、小脳顆粒細胞ではインビトロ及びインビボでErbB2の発現よりも強かった。サイクリックAMP応答部位結合タンパク質 (CREB) のリン酸化が、ErbB4シグナル伝達経路のさらに下流に関与していた (Taberbero A 他 Mol Cell Neurosci, 10, 309-322(1998))。PMAで処理後の脳橋核ニューロン及び顆粒

細胞の培養物の条件培地を回収し、濃縮し、顆粒細胞に5～10分間適用した。抗ErbB4抗体による免疫沈降後に、顆粒細胞からのライセートをSDS-PAGEで解析し、プロットを抗-ホスホチロシン抗体(抗-TYK)で検出した。トランスフェクションしない脳橋核ニューロン(None)、ベクターをトランスフェクションした脳橋核(vPN)、NRGをトランスフェクションした脳橋核ニューロン(tPN)、ベクターをトランスフェクションした顆粒細胞(vGC)、及びmNRGをトランスフェクションした顆粒細胞(tGC)から、条件培地を回収した。mNRGをトランスフェクションした脳橋核ニューロン及び顆粒細胞は共に、トランスフェクションしないニューロン及びベクターのみをトランスフェクションした細胞と比較して、強いリン酸化活性を示した(図6B、図6C)。上昇したsNRG量は、顆粒細胞を用いてErbBリン酸化によって確認した。mNRGをトランスフェクションしたニューロンから得られた条件培地による180kDのチロシン-リン酸化バンドは、PMA刺激を用いた場合に顕著であった(図6B)。トランスフェクションした脳橋核ニューロン及び顆粒細胞をPKC阻害剤であるH7で処理した場合の条件培地では、リン酸化活性は抑制された。内在性NRGはErbBリン酸化の顕著な活性を示さなかった。しかし、リコンビナント(組み換え)mNRGを培養ニューロンにトランスフェクトした場合、ErbB4リン酸化は顕著であった。これらの結果は、PKC活性化後にsNRGが組み換えmNRGから産生したことを示す。図6Cにおいて、リン酸化の比率は、ErbB4抗体による免疫沈降後にプロットしたErbB4シグナルに対して標準化した。

【0037】

CREB-リン酸化の結果を図6のDに示す。PMA刺激(60分間)により放出される可溶型をスピンカラムを用いて濃縮し、培養顆粒細胞に添加した。刺激した顆粒細胞を固定後、抗ホスホCREB抗体で染色した。脳橋核ニューロンからの条件培地を刺激(a、b及びc)のために使用し、顆粒細胞培養物からの条件培地を刺激(d、e及びf)のために使用した。パネルDは、コントロール(a、d)、ベクター(b、e)及び全長NRG(c、f)を示す。条件培地(c及びf)は、切断された内在性及び組み換えのNRGを有するはずである。cからbの引き算及びfからeの引き算は、組み換えmNRG由来のsNRGにより誘発され

るCREBリン酸化を示す。条件培地による5分以上の処理後に、異なるCREBリン酸化が観察された。生培養顆粒細胞を使用した場合には、KC1刺激によるNRGの放出は明白には観察されなかった。

【0038】

全長mNRGをトランスフェクションした脳橋核ニューロン及び顆粒細胞からの条件培地は、ErbB-及びCREB-リン酸化の異なる活性を示した。ErbB-及びCREB-リン酸化活性の測定から、タンパク質分断に必要なアミノ酸配列を同定した。図6E及び6Fに示す通り、ELYQKRVL T領域内の欠失変異体は、タンパク質分断を明白には示さなかった。この領域内のKからGへの点変異は表、図6Fに示す通り切断の減少を生じた。NRGはメタロプロテアーゼ (ADAMs) ファミリープロテアーゼの基質として報告されている (Shirakabe K 他 J Biol Chem, 276(12), 9352-9358(2000))。メタロプロテアーゼによるNRG切断は、主としてゴルジ体で起こると報告されている。mNRGのある種のタンパク質分断は細胞表面で起こることが報告されている (Loeb JA 他 Mol Cell Neurosci, 11(1-2), 77-91(1998))。NRGのタンパク質分断は、細胞の種類、NRG及びプロテアーゼのタンパク質局在、及び時期に依存して複数のプロテアーゼによって調節されている可能性がある。

【0039】

(2) パターン化電気刺激によるNRGのタンパク質分断

CREB-リン酸化活性を、抗-PCREB抗体を用いた免疫細胞化学分析により測定し、電気刺激による小脳顆粒細胞のCREBリン酸化の最適条件を調べた。顆粒細胞を異なる周波数で5分間電氣的に直接刺激した (図7のA及びB)。1Hzから100Hzの周波数でリン酸化活性が検出され、50Hzが最適であった。50HzでのCREB-リン酸化活性は、ナトリウムチャンネルブロッカーTTXで36.6 ± 5.45%ブロックされた。図Bにおいて、PCREB-陽性細胞を計測し、全細胞数に対して標準化した。これらの実験は、異なる周波数によりニューロン細胞内に異なる状況が生じることを示唆する。NRGのタンパク質分断に最適な周波数は50Hzであった。

【0040】

NRGのタンパク質分断が異なるパターンの電気刺激で生じるかどうかを確かめるために、異なる周波数での電気刺激後に、ErbBリン酸化を抗-TYK及び抗-ErbB4抗体を用いた免疫沈降により検出した。GC及びPNN培養物を、刺激装置にパラレルに接続したマルチ白金電極を装着した35mm皿中で電氣的に刺激した。電気刺激は、定常電流で30秒間、0.1~100Hzで連続的に送られる0.2msecの矩形パルスの交流(1mA)で行なった。十分に切断された形のNRGを入手するために、ニューロンを異なる周波数で30分間刺激した。各々の刺激により、刺激されたニューロンには、異なる定常状態のカルシウムレベルが付与される。高周波数は高い定常状態のカルシウムレベルを示す。刺激中の培地のpH及び温度は、刺激しない場合と同じであった。

【0041】

抗-ErbB4抗体で落とした切断型NRGは、抗TYK抗体を用いた免疫プロットにより検出した。リン酸化の効率は、ErbB4シグナルに対して標準化することにより測定した。リン酸化シグナルは、他の周波数の場合と比較して50Hzの刺激で有意に強かった(図8A及び図8B)。条件培地のCREB-リン酸化活性も50Hzの刺激が最適であった(図8C及び図8D)。さらに、PNNからの条件培地もCREBリン酸化においてGCと同様の傾向を示した。50Hzの刺激で、 $77.4 \pm 2.08\%$ のGCはPCREB陽性であり、100Hzの刺激では、 $62.5 \pm 4.17\%$ のGCがPCREB陽性である。PCREBの反応ピークは50Hzで観察された($n=15$ 、コントロールに対して $P<0.00018$ 、t検定)。50Hzの刺激によるCREBリン酸化はH7により阻害された($n=7$ 、50Hz刺激に対して $P=0.003$)。非切断型のNRG(欠失変異体)を顆粒細胞にトランスフェクションし、細胞を50Hzで刺激した場合、pCREBの数は有意に減少した($n=5$ 、50Hz刺激に対して $P=0.005$)。

【0042】

上記方法を使用後、図8E~Gに記載した方法を使用して切断型のNRGを検出した。実施例1で作製した切断型ニューレグリンのC末端のみを認識する抗体(抗sNRG抗体)を使用した。電気刺激後、約 5×10^7 個のトランスフェクションした顆粒細胞を使用して条件培地を回収した。100kD以上及び10k

D未満のタンパク質をセントリコン10及び100遠心濾過を用いて除去し、セントリコン10によりさらに濃縮した。その後、抗sNRG抗体を用いて免疫沈降を行い、NRGの β 1アイソフォームのみを認識できる抗-NRG β 1抗体を用いてイムノブロットした。ブロットを図8Gに示す。切断したNRGのシグナルは約30～40kDの位置に検出された。H7で50Hzの刺激の場合、切断型のNRGのシグナルは明白には検出されなかった。以上の結果から、sNRGは、特定のパターンの電気刺激により開始かつ制御されたタンパク質分断によりmNRGから産生することが判明した。

【0043】

実施例3：伝達受容体発現機構の解析

(方法) NMDA及びGABAA受容体サブユニットのリアルタイム定量分析

電気刺激後、リアルタイム定量分析 (ABI prism 7700; Perkin Elmer) を行った。Primer Express (PE Biosystems) を用いてプライマー及びTaqManプローブを設計した。各プライマーにより増幅したPCR産物はアガロースゲル上でシングルバンドであった。産物を直接配列によって確認した。使用した全プライマーは他の遺伝子と交差しなかった。薬理実験では、TTX ($1\mu\text{M}$, Tocris)、D-AP5 ($50\mu\text{M}$, Tocris)、MK801 ($25\mu\text{M}$, Tocris)、CNQX ($10\mu\text{M}$, Tocris)、Cd ($100\mu\text{M}$, Wako Inc.) 及びEGTA (1mM , Sigma) を使用した。

【0044】

(結果) 電気刺激により制御されたNMDA及びGABAA受容体サブユニットの発現

NMDA及びGABAA受容体サブユニット発現を制御できる電気活性のパターンを調べた。リアルタイム定量化ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を用いて、NMDA及びGABAA受容体サブユニットのmRNAの発現を、インビトロで1～21日目の培養中で定量した。まず、培養顆粒細胞中のNMDA及びGABAA受容体の各サブユニットのmRNA発現レベルを調べた (図9A)。ニューロン特異的エノラーゼ (NSE) を対照として用いた。P7マウスから調製した7DIV (days in vitro) 培養ニューロンの性質は、成熟期でインビボでP

14マウスのもものと理論的に同一である。インビボのP14で、NR2B発現は小脳顆粒細胞でシャットダウンする一方、NR2C発現は全顆粒細胞で見られる。NMDA受容体のサブユニットの切り替えはマウスではP14ではほぼ終了した。一方、GABAAの $\alpha 1$ 、 $\beta 2$ 及び $\gamma 2$ サブユニットはインビボのP14で大量発現していた。インビトロの状況をインビボに適合するように調整するために、インビトロで7日間培養した顆粒細胞を選択して電気刺激した。

【0045】

培養顆粒細胞を異なる周波数（0～100 Hz）で1 mAで30分間刺激した（図9B、9C）。刺激後の細胞の生物学的活性は化学染色及び抗NRG抗体染色によって確認したが、生細胞数の有意な差異は何れの場合も見られなかった。NMDA受容体NR2B及びGABAA $\alpha 2$ 、 $\gamma 1$ の場合、電気刺激の効果は何れの周波数でも明白には検出されなかった。NMDA受容体NR2Cサブユニットの発現は、1 Hz及び100 Hzの周波数での直接刺激によって促進され、100 Hzなどの高周波数での刺激で検出された増加はTTXによりブロックされた。1 Hzの刺激によるNR2Cの増加は、TTXにより強くはブロックされなかった。GABAA受容体 $\beta 2$ サブユニットの場合、mRNA発現は、0.1から10 Hzの低周波数の刺激で増加した。低周波数の刺激による増加はTTXにより部分的にブロックされたが、100 Hzによる $\beta 2$ の増加はTTXによりブロックされなかった。

【0046】

薬理学的実験によれば、NMDA及びAMPA受容体活性、並びにカルシウムチャンネルがNR2C及び $\beta 2$ 発現の保持に関与していることが示された。1 Hzで刺激したNR2Cでは、mRNAの発現はNMDA、AMPA受容体アンタゴニストにより強く阻害された。刺激周波数100 Hzでは、特にMK801（非競合NMDA受容体アンタゴニスト）がNR2C増加を強くブロックした。また、カルシウムチャンネルは、AMPA受容体よりもNR2C発現に寄与していた。1 Hzで刺激した $\beta 2$ では、刺激周波数1 HzのNR2Cの場合と同様の結果であった。100 Hzで刺激した $\beta 2$ のmRNAの増加は、NMDA、AMPA受容体アンタゴニスト及びカルシウムチャンネルブロッカー（非特異的ブロッ

カー; Cd & EGTA) により阻害された。NR2C 及び $\beta 2$ の両方の場合で、カルシウムチャンネルブロッカーは高周波数でサブユニットの発現を強く阻害したが、低周波数では阻害しなかった。異なる周波数は、関与する顆粒細胞受容体の組み合わせと活性の度合いを制御していることがわかる。また、特定の電気刺激は、アンタゴニスト及びブロッカーの存在下でも正常な活性を部分的に回復することができた。1 Hz の刺激でカルシウムチャンネルブロッカーを用いた場合の例を示す (図 9 C、 $\beta 2$ の場合)。

【0047】

(C) 考察

(実施例の考察)

図 10 に示す通り、小脳顆粒細胞は、NMDA 及び GABA_A 受容体を介して苔状線維及びゴルジ細胞からの興奮性及び抑制性シグナルの入力のバランスを取っていると考えられる。顆粒細胞のニューロン発火のパターンは、各種受容体の関与によってシナプス発達中に変化する。顆粒細胞における最終的神経活動のパターンは、伝達物質、神経ペプチド、及び神経栄養因子、並びに、シナプス前部ニューロンを含む環境刺激からの他のものなどの分子の組み合わせによって決まる可能性が高い。分子の異なる組み合わせは、分子の挙動と電気活性のパターンの関係において、異なるパターンのニューロン発火をもたらすはずである。幾つかの遺伝子発現がパターン化された電気活性によって調節されていることは既報である (Buonanno A 他 Curr Opin Neurobiol, 9, 110-120(1999))。パターン化された電気活性によって分子のリン酸化活性が制御されていることは確かである (Buonanno A 他 Curr Opin Neurobiol, 9, 110-120(1999))。

【0048】

実施例 2 では、タンパク質分断などのタンパク質プロセッシングが、パターン化された電気活性によって制御されることを実証した。NRG のタンパク質分断は低周波数から高周波数で検出されたが、シナプス前細胞である苔状線維とシナプス後細胞である顆粒細胞からの NRG のタンパク質分断に最適な刺激周波数は共に 50 Hz であった。この現象は、分子的観点から、シナプス前後細胞間で神経活動のパターンが同調する機構を裏付けている。シナプス前部シグナルは先ずシ

ナプス後部ニューロンを活性化し、次に、シナプス前部及びシナプス後部ニューロンを同調させる。シナプス後部細胞がシナプス前部細胞と同調する際に、シナプス後部ニューロンはオートクライン機構で自己活性化し、第III期に入る可能性がある(図10)。シナプス形成過程において、シナプス前部ニューロンからのシグナルや逆行性シグナル伝達を介した分子情報の交換の後に、mNRGは刺激依存型のタンパク質分断を受ける可能性もある。何れの場合も、50Hzの刺激はシナプス前部及びシナプス後部のニューロンの間の伝達における中間段階と考えられる(図10のII)。

【0049】

さらに、sNRGにより調節されるNR2C及び $\beta 2$ 発現の分子機構が明らかになった。低周波数の刺激では(1Hz)、 $\beta 2$ RNAはグルタミン酸受容体及びErbB受容体の活性化を介して、NR2C RNAよりも多量に転写された。NR2C mRNAは、高周波数(100Hz)では $\beta 2$ よりも強く誘導され、グルタミン酸受容体(特に、NMDA受容体)の活性化を伴った。NRGのタンパク質分断の最適周波数である50Hzでは、NR2C及び $\beta 2$ サブユニット発現は観察できなかった。NR2C発現にはニューロン活動が必要であり、可溶型のNRGの産生効率は電気活動によって制御されている可能性は既に提唱されている(Ozaki M 他 The Neuroscientist, 7(2), 146-154(2001))。本実施例では、NRGのタンパク質分断が周波数に依存した形で電気活動のパターンによって制御されていることを初めて実証した。NRGはNR2C及び $\beta 2$ サブユニット発現を誘導するのに必要であるけれども、発現段階(図10のI及びIII)及び中間段階(図10のII)の間で周波数の最適値に不一致が生じた。この不一致を説明するために、薬理学的実験を行った。この薬理学的実験の結果から、ErbB受容体を含む複数の受容体がNR2C及び $\beta 2$ サブユニット発現の制御に関与していることが判明した。

【0050】

直接的電気刺激実験から、以下の2つの事項が示唆される。(1) 遺伝子発現を誘導するために必要な受容体の活性化には、細胞自身のもつ神経活動が必要な場合があり、(2) 直接的電気刺激は、受容体及びイオンチャンネルブロッカー

の効果を部分的に補うことができる（図 9、C）。シナプス成熟の過程において、特定のパターンのニューロン活性と受容体活性化の間にカスケードが存在する可能性がある（図 11）。受容体 A が活性化される場合、ニューロンはパターン A の神経活動を有する。次に、受容体 B がパターン A によって活性化され、パターン B が產生する。その結果、ニューロンはパターン A と B をあわせた活動パターンを有する。カスケードにおける各パターンの活動が分子挙動を制御する可能性がある。特定のパターンが分子挙動を制御し、ニューロン発火のパターンが、個々の受容体又はチャンネルの活性化の組み合わせによって構成されていると考えられる。構成された各パターン内に遺伝子発現リン酸化タンパク質のプロセッシングなどの分子の挙動を制御する一定の過程が存在するはずである。従って、活性化した受容体及びイオンチャンネルの組み合わせ及びそれらの活性化の順序が、上記した不一致を解くための鍵を握っている可能性がある。

【0051】

さらに、アンタゴニスト及びブロッカーによりブロック可能な受容体の幾つかの作用は、特定の電気刺激によって補うことができた。これは、シナプス前部ニューロン、受容体及びチャンネル活性の役割がある特定パターンの電気活性によって模倣できることを意味する。従って、ニューロン形成を人工的に制御する電気活性のパターンの役割を調べることは重要である。

【0052】

【発明の効果】

本発明によれば、電氣的刺激が直接細胞に及ぼされないから、細胞へのダメージが小さく、また多数の細胞に一度に電氣的刺激を与えることができる。また細胞が電流の流れる通路に置かれるようになるため、細胞の電氣的刺激を短時間で効率的に行えるようになる。即ち、本発明によれば、生体外で効率よく大量の神経細胞に、細胞を傷つけることなく、直接電気刺激を与えることができる。

【0053】

【配列表】

<110> RIKEN

<120> A device for cell stimulation and a method for stimulating cells

<130> A11457A

<160> 2

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Synthetic peptide

<400> 1

Cys Glu Glu Leu Tyr Gln

1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Synthetic peptide

<400> 2

Cys Glu Leu Tyr Gln Lys

1 5

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、第一の電極が円形のリング電極（小型）であり、第二の電極が一本の点電極である場合の細胞刺激装置を示す。

【図 2】

図 2 は、第一の電極が円形のリング電極（大型）であり、第二の電極が一本の点電極である場合の細胞刺激装置を示す。

【図 3】

図 3 は、第一の電極が円形のリング電極（大型）であり、第二の電極が複数の多点電極である場合の細胞刺激装置を示す。

【図 4】

図 4 は、第一の電極が円形のリング電極であり、第二の電極がメッシュ状のシート状電極である場合の細胞刺激装置を示す。

【図5】

図5は、第一の電極が円形のリング電極であり、第二の電極が多点電極を含むシート状電極である場合の細胞刺激装置を示す。

【図6】

図6は、PMA刺激によるニューレグリンのタンパク質分断を示す。

脳橋核ニューロン及び小脳顆粒細胞を7DIV (days in vitro) で抗NRG β 1抗体で染色した。両ニューロンで、細胞体及びニューロン性プロセスはNRG陽性であった(図A)。スケールバー; 60 μ m

図Bでは、脳橋核ニューロン及び顆粒細胞を、膜貫通型のNRGをトランスフェクションしたものとししないものについて調製し、PMAで60分間刺激し、条件培地を回収した。条件培地のチロシンリン酸化活性を小脳顆粒細胞を用いて調べた。顆粒細胞培養物を、回収・濃縮した条件培地で5～10分間刺激した。顆粒細胞からのライセートをSDS-PAGEで分解し、プロットを抗-ErbB4抗体で免疫沈降した後、抗ホスホチロシン抗体(4G10)で検出した。180 kDのチロシンリン酸化したバンドを刺激により検出した(図B)。条件培地をPN(トランスフェクションしない脳橋核ニューロン)、tPN(トランスフェクションした脳橋核ニューロン)、GC(トランスフェクションしない顆粒細胞)、及びtGC(トランスフェクションした顆粒細胞)から回収した。結果を図Cに要約する。実験は独立に3又は4回繰り返した。

図Dでは、小脳顆粒細胞を用いて、条件培地刺激後のCREB-リン酸化を確かめた。血清飢餓小脳顆粒細胞を、脳橋核ニューロン及び顆粒細胞培養物から回収した条件培地で処理した(5～10分間)。脳橋核ニューロンからの条件培地をa、b及びcにおいて刺激のために使用した。d、e及びfでは、条件培地を顆粒細胞培養物から調製した。

a、d: 対照

b、e: ベクター (pEGFP-N3)

c、f: pNRG-GFP

刺激した顆粒細胞は、固定化後、ホスホ-CREB抗体で染色した。PMA刺激(60分間)により放出された可溶型を濃縮し、培養顆粒細胞に加えた。条件培地

は、パネル c 及び f において内生の NRG 及び組み換え NRG を含むはずである。b 及び e からの差し引きは、組み換え mNRG から切断された NRG の作用を示した。ErbB 及び CREB リン酸化アッセイ系を使用して、E 及び F においてタンパク質分解に必要なアミノ酸配列を同定した。E L Y Q K R V L T 配列は膜貫通ドメインの細胞外並列の上に位置していた。配列を欠失またはリジンからグリシンに変異させた場合、タンパク質分解の効率は F に示す通り阻害された。リジン残基はプロテアーゼによる認識に必須のアミノ酸であった。

【図 7】

図 7 は、電気刺激による CREB-リン酸化活性を示す。

脳橋ニューロン及び小脳顆粒細胞を 18 日齢の胎児マウス及び生後 7 日のマウスからそれぞれ調製した。ニューロンを 7 日間培養し、異なるパターンの電気刺激で刺激した。電気刺激後、CREB-リン酸化を顆粒細胞を用いて調べた（図 A 及び B）。抗 PCREB 抗体に陽性の細胞を計数し、全細胞数に対して標準化した。各皿からランダムな 5 箇所の顕微鏡視野（20 倍）を細胞計数のために撮影した。独立した実験から、3～5 枚の皿を計数した。CREB リン酸化の効率は 50 Hz 刺激で最高であった。リン酸化は TTX により部分的にブロックされた。

【図 8】

図 8 は、電気刺激による NRG のタンパク質分断を示す。

電気刺激後、ErbB4 のチロシンリン酸化活性を PMA 刺激により同一の方法で測定した。パネル A は、脳橋核ニューロン及び顆粒細胞においては、ErbB4 に対する条件培地のチロシン-リン酸化活性の効率が 50 Hz の刺激で最高あることを示す。チロシンリン酸化は PKC 阻害剤である H7 によりブロックされた。結果をグラフに要約する（図 B）。図 C 及び D では、小脳顆粒細胞を用いて条件培地刺激による刺激後に、CREB リン酸化を確認した。血清飢餓小脳顆粒細胞を、電気刺激後の顆粒細胞培養物から回収した条件培地で試験した（15 分間）。

Full-NRG: これらの実験では、全長 NRG を顆粒細胞にトランスフェクションした。

Del-NRG: NRG のアミノ酸番号 197～216 を欠失させ、タンパク質はタンパク質分解に耐性である。

最後に、免疫沈降後のイムノブロットにより切断されたNRGを直接検出した結果をGに示す。検出の手法を図E及びFに要約する。mNRGを電気刺激後にトランスフェクションした（トランスフェクション効率； $\sim 5\%$ ）約 5×10^7 個の顆粒細胞から、条件培地を回収した。培地をセントリコンを用いて濃縮し、抗-sNRG抗体で免疫沈降した。抗体としては、切断型NRGのc末端のみを認識する抗sNRGポリクローナル抗体（実施例1で作成した抗体）を使用した。免疫沈降後に、NRG $\beta 1$ のみを認識する抗NRG $\beta 1$ 抗体を用いてウエスタンブロット分析を行った。図Gに示す通り、50Hzの刺激で切断型NRGのシグナルが検出できた。このシグナルはPKC阻害剤であるH7により消失した。これらの結果から、培地中に放出されたNRG量は周波数の刺激に応じて異なることが分かる。

【図9】

図9は、リアルタイム定量PCR法により定量したNMDA及びGABAA受容体サブユニット発現を示す。

図Aでは、インビトロで1～21日間10mMのKC1を用いて培養した顆粒細胞を用いて、NMDA及びGABAA受容体サブユニット発現を調べた。電気刺激実験のために7DIV（days in vitro）を選択した。7DIVでは、顆粒細胞は未だ生きているが、NMDA受容体、NR2C、2B及びGABAA受容体 $\beta 2$ サブユニットmRNAは減少している。GABAA受容体 $\alpha 1$ 及び $\gamma 2$ mRNAは7DIVでは保持されていた。異なるパターンの電気刺激後にRT-PCRのリアルタイム定量分析を行った。NR2C及び $\beta 2$ サブユニットの転写を異なる周波数で制御した。NR2C転写は、1.0及び100Hzの刺激で促進され（図B）、100Hzで検出された増加はTTX処理でブロックされた。しかし、1.0Hzでの増加はTTXでは強くはブロックされなかった。一方、 $\beta 2$ 転写は、0.1～10Hzの刺激でNR2Cよりも強く促進され、増加はTTX処理でブロックされた。100Hzでの増加はTTXで部分的にブロックされた。0.1Hz；n=6、1Hz；n=18、10Hz；n=10、50Hz；n=12、100Hz；n=26、TTXで非刺激；n=3、1Hz及びTTX；n=6、100Hz & TTX；n=6、* $p < 0.001$ 、** $p < 0.00$

001

図Cでは薬理実験を電気刺激の下で行った。NR2Cの場合、1及び100Hzで増加した転写は全てのアンタゴニスト及びブロッカーにより部分的にブロックされた。しかしながら、MK801はNR2C mRNA発現を強くブロックした。 $\beta 2$ の場合、MK801に加えてCNQXは1.0及び100Hzの刺激で転写をブロックした。100HzでのmRNAの増加は非特異的カルシウムブロッカーにより強く阻害されたが、1.0Hzでの増加は明らかにブロックされなかった。何れの場合も、直接的電気刺激は、少なくとも基底レベルまで受容体の活性化を部分的に模倣できた。AP5; 競合NMDA受容体アンタゴニスト、MK801; 非競合NMDA受容体アンタゴニスト、CNQX; AMPA受容体アンタゴニスト、Cd&EGTA; 非特異的カルシウムチャンネルブロッカー。各実験は独立に3～8回繰り返した。

【図10】

図10は、周波数依存形式で制御されたNMDA及びGABAA受容体サブユニット発現の模式図を示す。

小脳顆粒細胞は、苔状線維から興奮シグナルを、そしてゴルジ体からGABAA受容体を介して阻害シグナルを受ける。これらの活性の組み合わせが、ニューロン活性のパターンを決定する。苔状線維によって刺激されない顆粒細胞でも自発的活性を有する。比較的低い周波数において、NR2C及び $\beta 2$ サブユニット発現は共に検出されたが、 $\beta 2$ 発現はNR2Cよりも促進された(I)。一方、NR2C発現は、100Hzのような高周波数でより強く誘導された。NR2Cの発現は苔状線維刺激顆粒細胞で誘導される可能性があり、相当量の受容体活性化に参与している(III)。

【図11】

図11は、受容体活性化のモデル及びニューロン活性のパターンを示す。

【符号の説明】

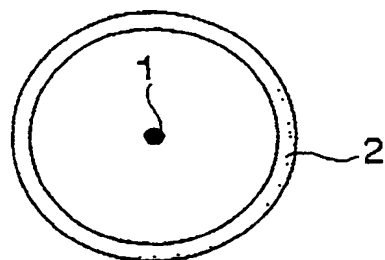
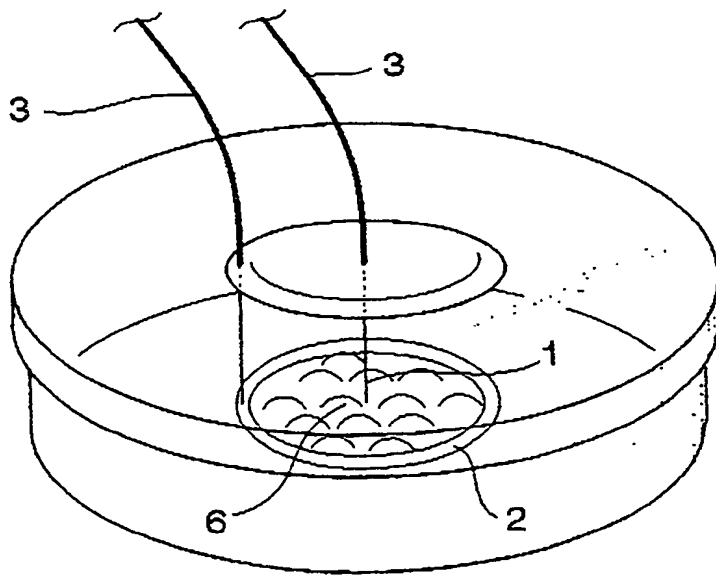
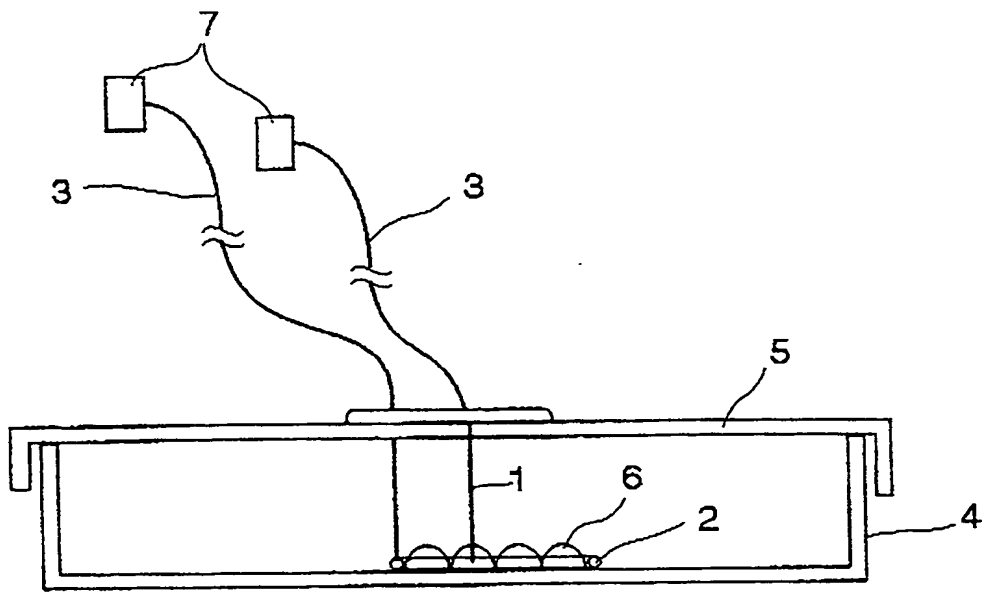
- 1 正(又は負)の電極
- 2 負(又は正)の電極
- 3 配線

- 4 培養容器本体
- 5 培養容器蓋部
- 6 細胞
- 7 電源

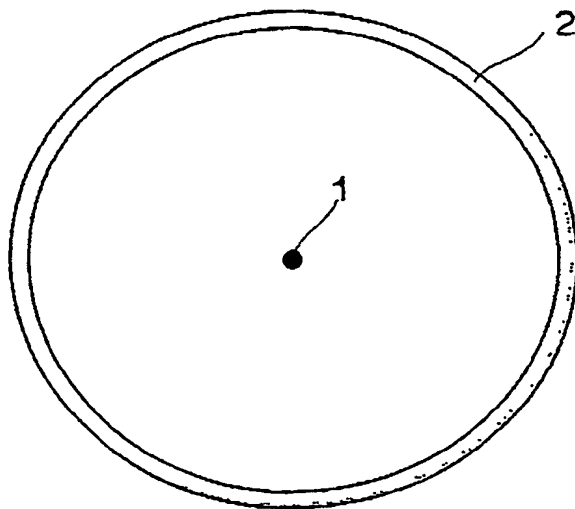
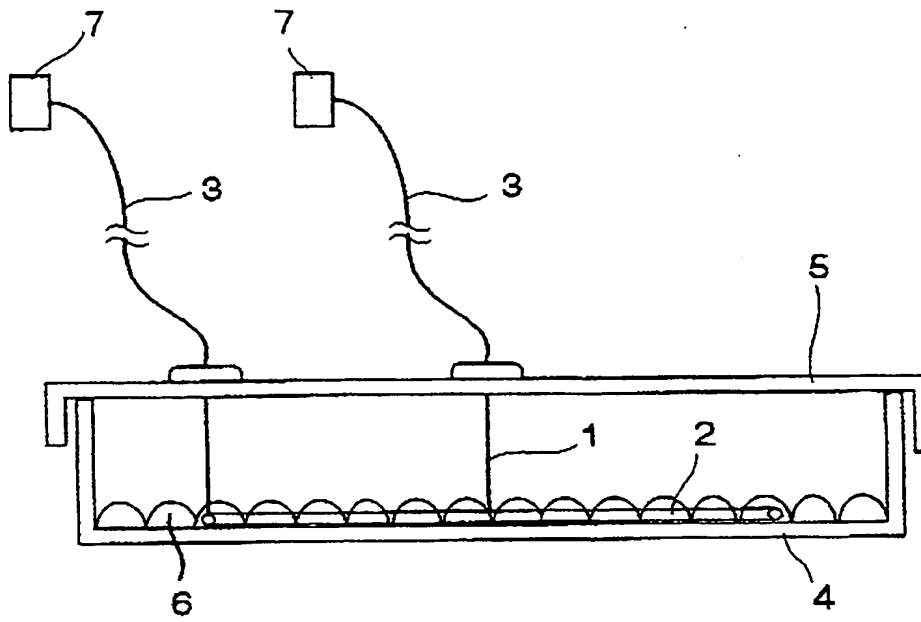
【書類名】

図面

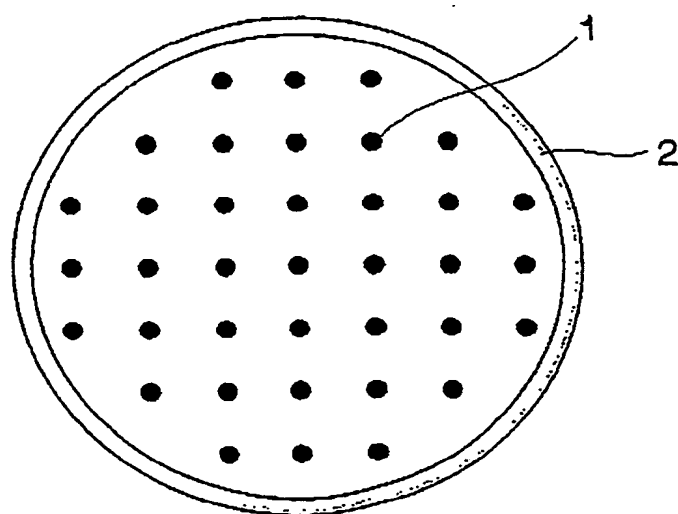
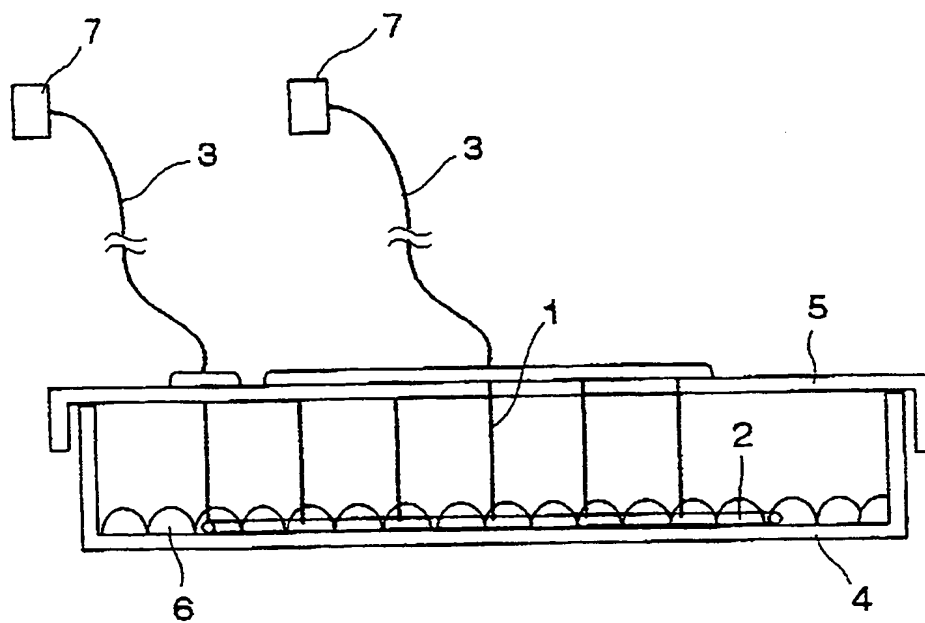
【図 1】



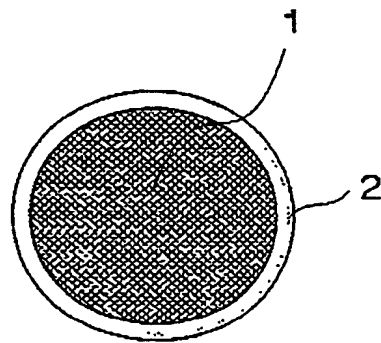
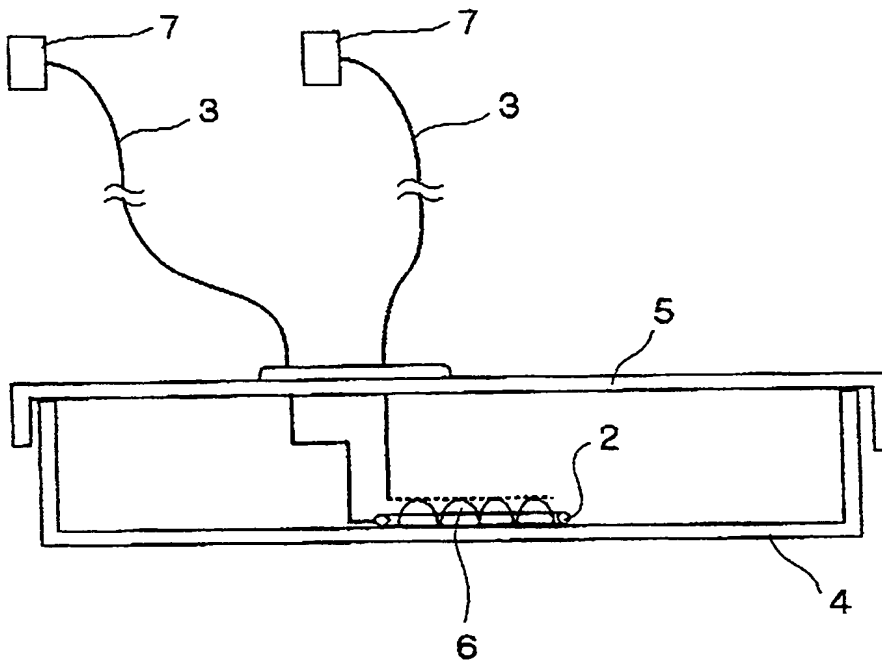
【図 2】



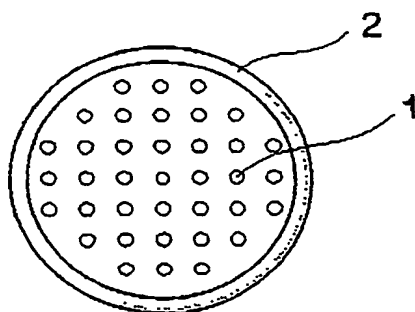
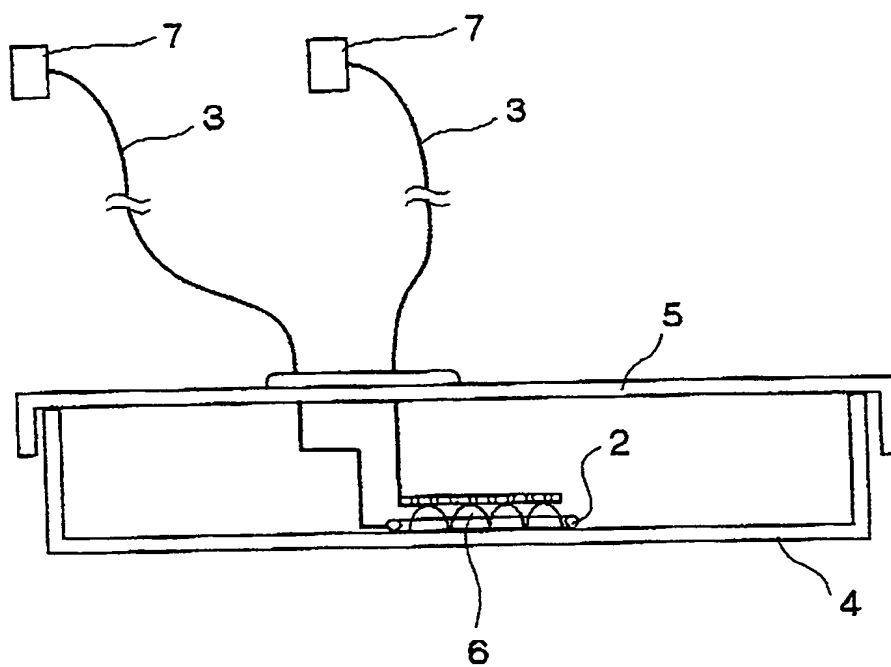
【図 3】



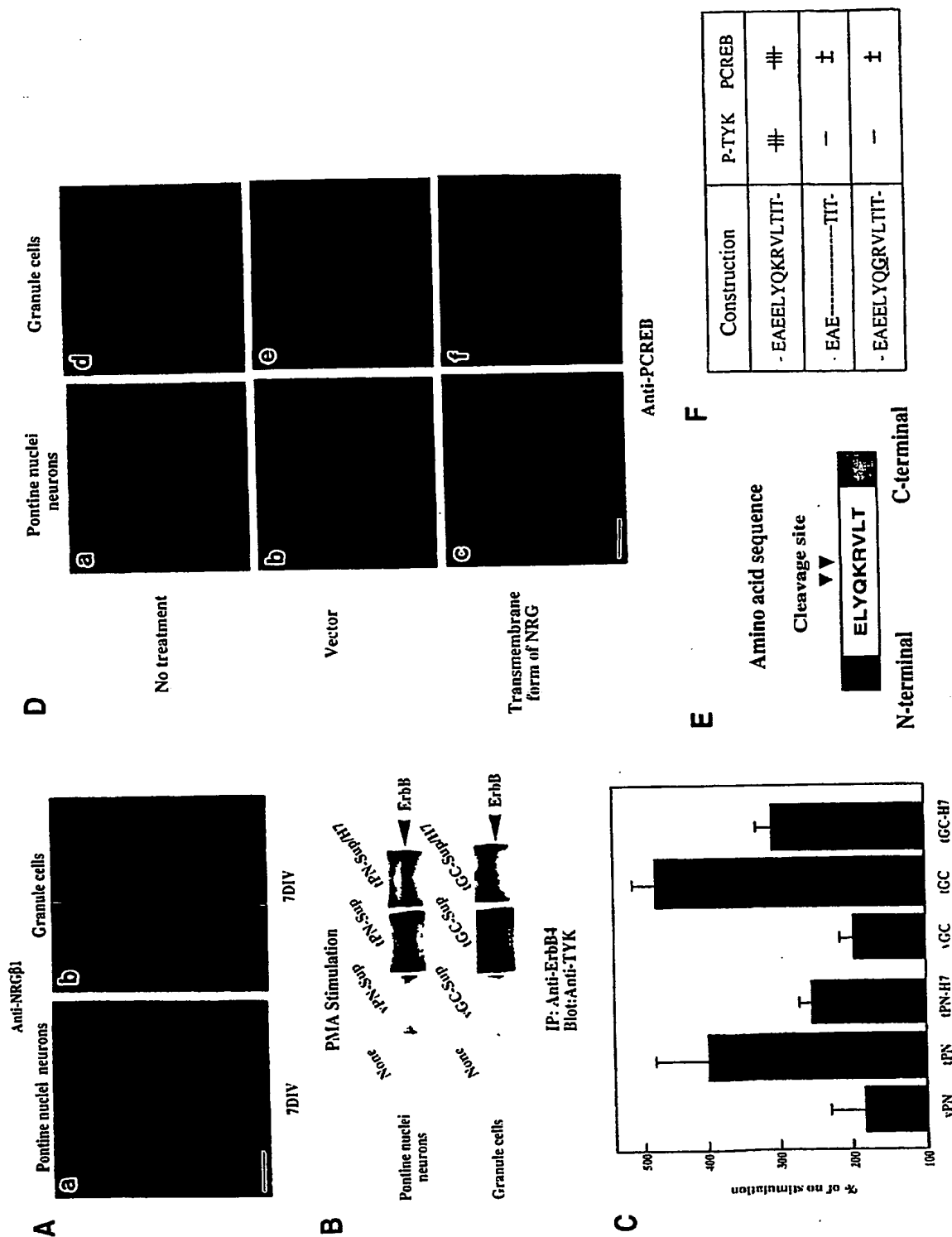
【図 4】



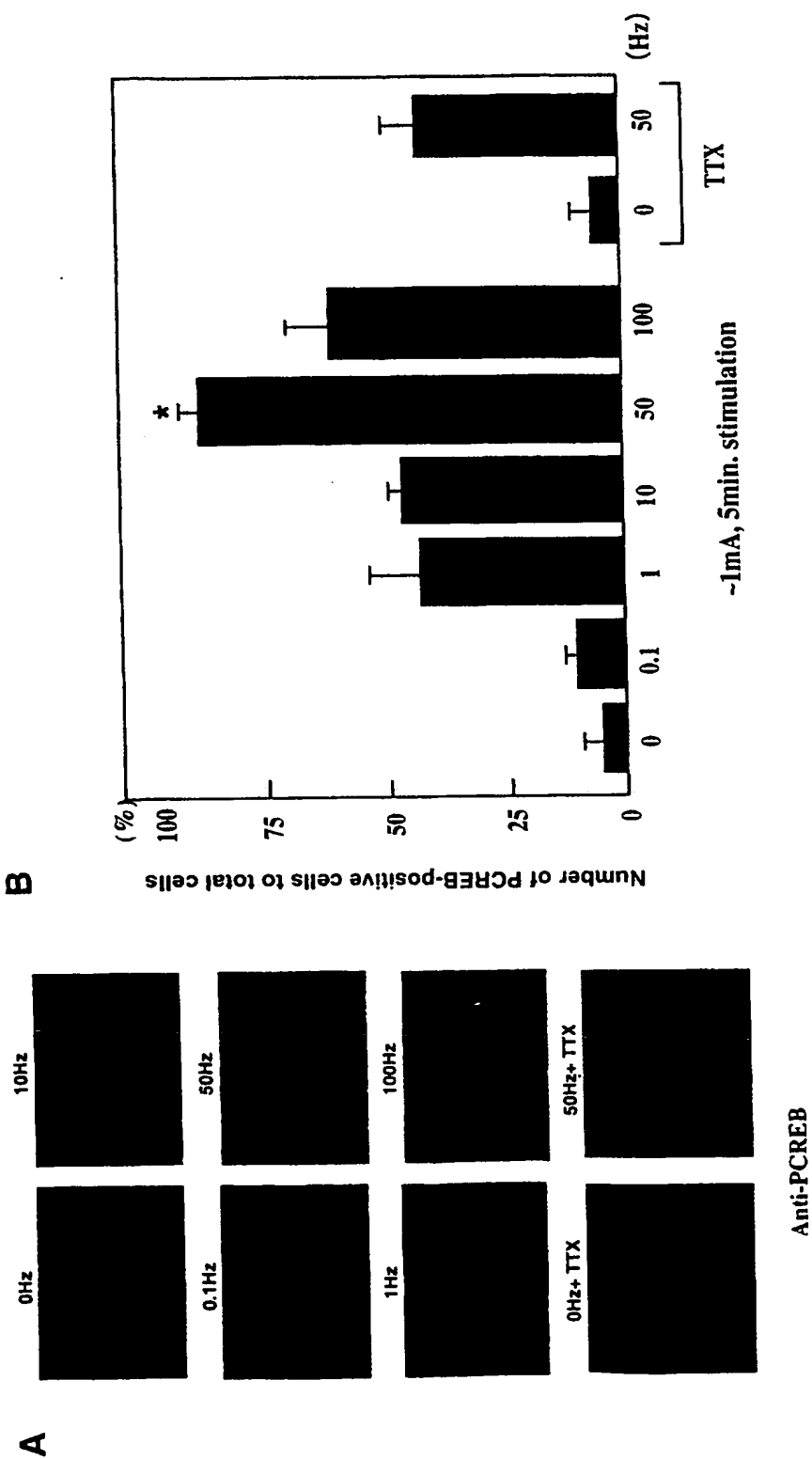
【図 5】



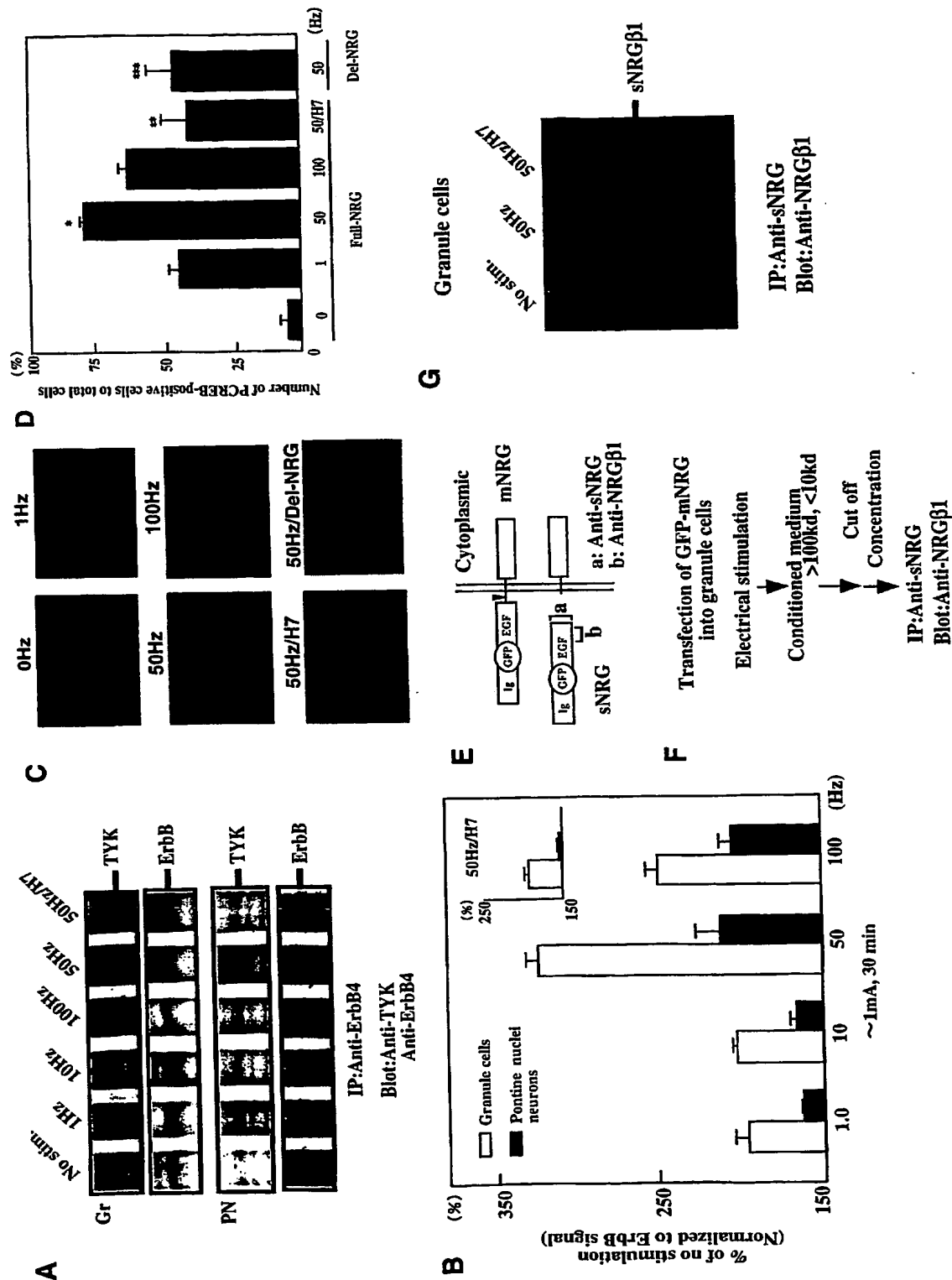
【図 6】



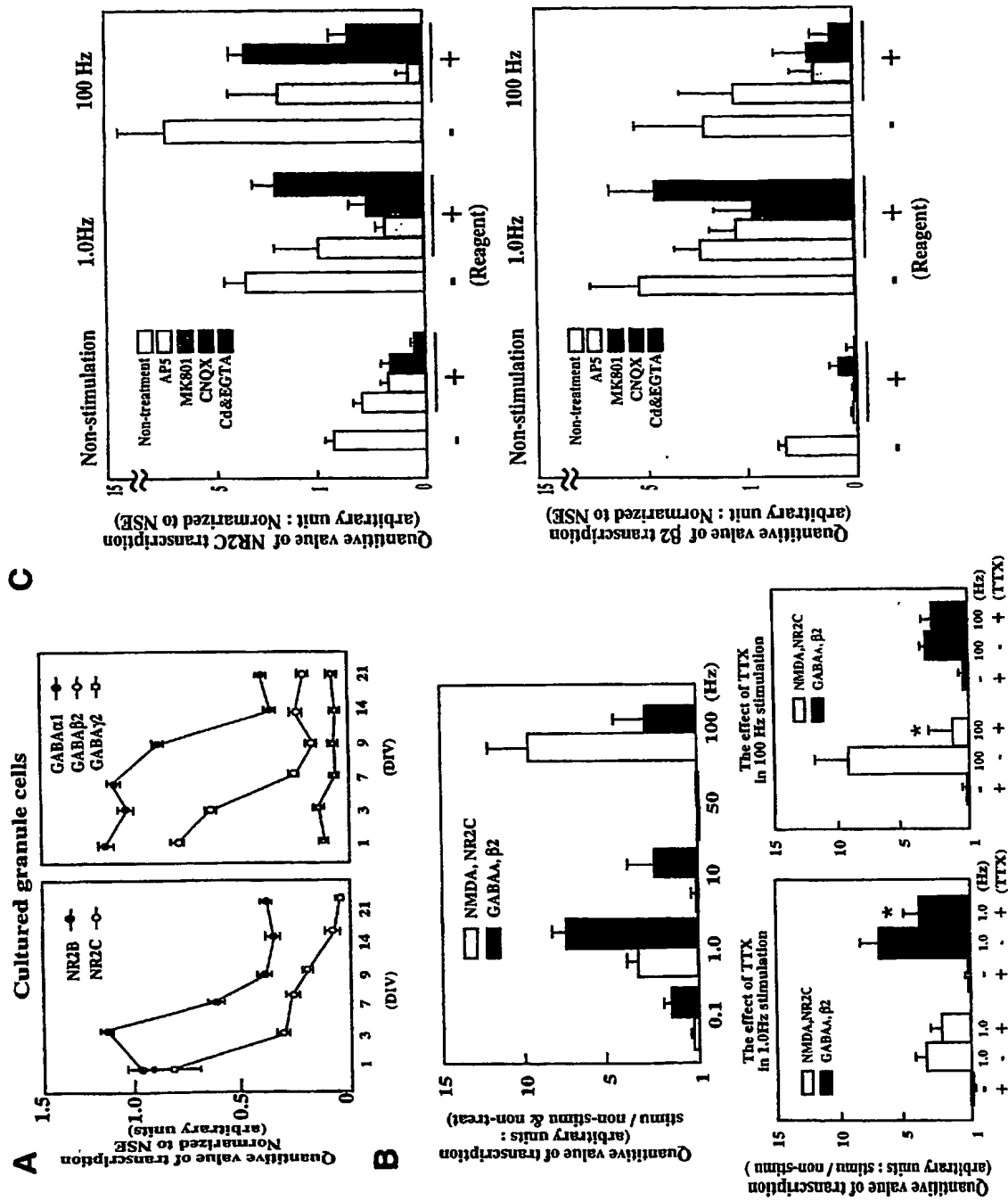
【図 7】



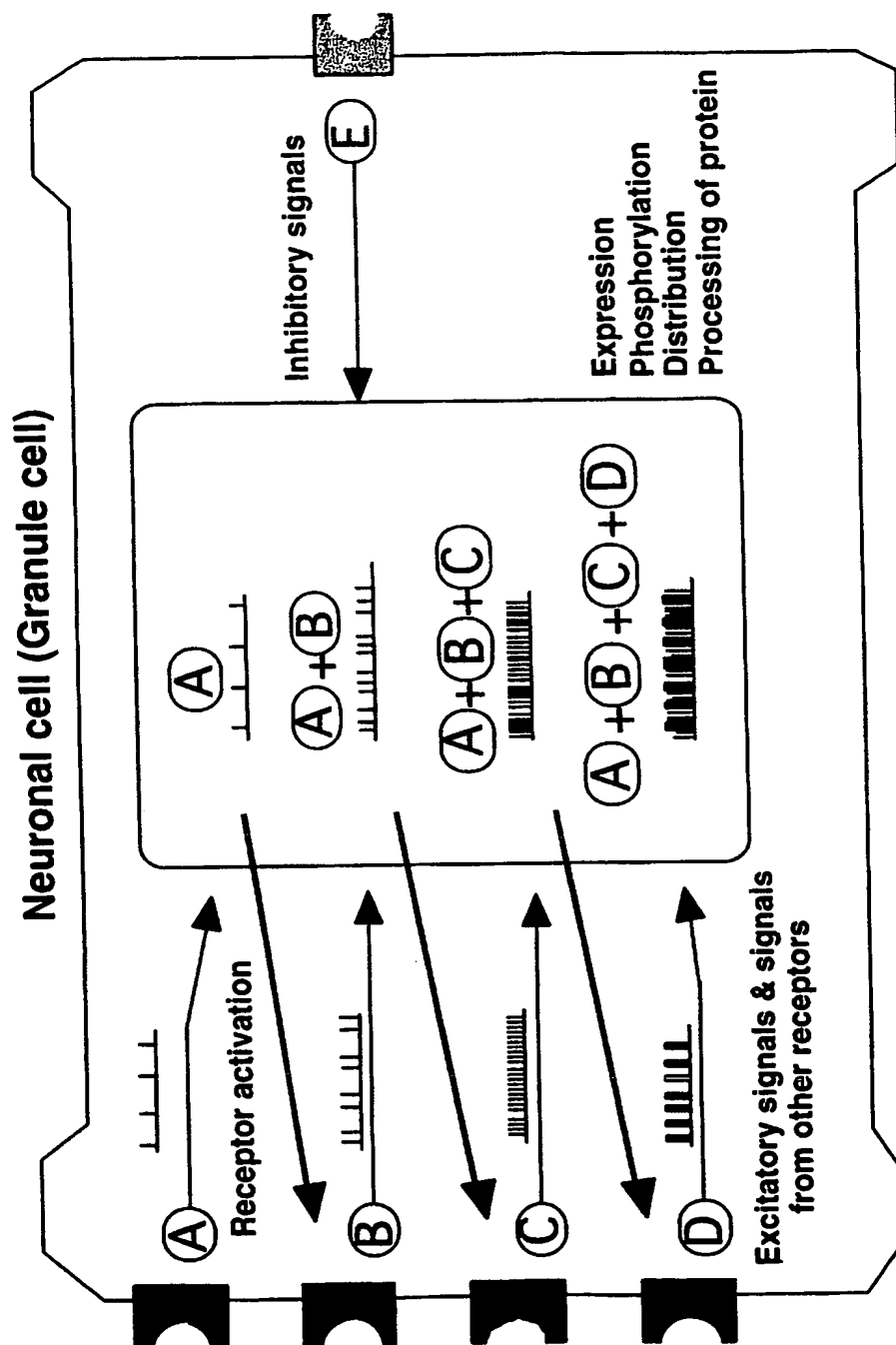
【図 8】



【図 9】



【図 11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 生体外で効率よく大量の神経細胞に、細胞を傷つけることなく、直接電気刺激を与えるための電気刺激装置を提供すること。

【解決手段】 培養細胞を入れるための培養容器の一方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち一方の第一の電極と、前記培養容器の他方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち他方の第二の電極とを備え、前記第一の電極と前記第二の電極とにより細胞を刺激する電場を形成することを特徴とする、細胞刺激装置。

【選択図】 図 1

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)
【提出日】 平成15年12月 1日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2003-116895
【承継人】
 【識別番号】 503359821
 【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
 【氏名又は名称】 独立行政法人理化学研究所
【承継人代理人】
 【識別番号】 100075812
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 吉武 賢次
【提出物件の目録】
 【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
 【援用の表示】 平成15年11月20日提出の特許第1575167号外98件
 にかか一般承継による特許権の移転登録申請書
 【物件名】 登記簿謄本 1
 【援用の表示】 平成15年11月20日提出の特許第1575167号外98件
 にかか一般承継による特許権の移転登録申請書
 【物件名】 委任状 1

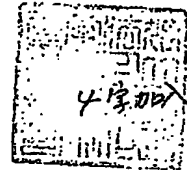
【物件名】

委任状

【添付書類】

(1)  735

委 任 状



私は、

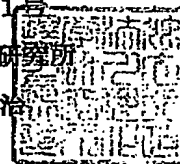
識別番号 100075812 弁理士 吉 武 賢 次 氏
を代理人と定めて下記事項を委任する。

1. 別紙目録に記載の特許出願に関する出願人名義変更届をする件
954件
2. 上記各項の手続を処理するため復代理人を選任及び解任する件

以 上

平成 / 5 年 / 1 月 / 3 日

住所又は居所 埼玉県和光市広沢2番1号
氏名又は名称 独立行政法人 理化学研究所
代 表 者 理事長 野 依 良 治



目録(1)

- | | |
|---------------------------------|-------------------|
| 1. 特願昭63-235737 | 51. 特願平07-327372 |
| 2. 特願平05-044143 | 52. 特願平08-000652 |
| 3. 特願平05-127257 | 53. 特願平08-026368 |
| 4. 特願平05-127258 | 54. 特願平08-030850 |
| 5. 特願平05-213675 | 55. 特願平08-041279 |
| 6. 特願平05-306164 | 56. 特願平08-045903 |
| 7. 特願平05-328611 | 57. 特願平08-051604 |
| 8. 特願平05-336746 | 58. 特願平08-065715 |
| 9. 特願平06-035100 | 59. 特願平08-070071 |
| 10. 特願平08-061792 | 60. 特願平08-105667 |
| 11. 特願平06-061793 | 61. 特願平08-107784 |
| 12. 特願平06-069150 | 62. 特願平08-116473 |
| 13. 特願平06-097098 | 63. 特願平08-123475 |
| 14. 特願平06-111624 | 64. 特願平08-127005 |
| 15. 特願平06-121100 | 65. 特願平08-131746 |
| 16. 特願平06-145908 | 66. 特願平08-132846 |
| 17. 特願平06-158670 | 67. 特願平08-132854 |
| 18. 特願平06-158671 | 68. 特願平08-142676 |
| 19. 特願平06-165751 | 69. 特願平08-158078 |
| 20. 特願平06-165752 | 70. 特願平08-167401 |
| 21. 特願平06-181857 | 71. 特願平08-196331 |
| 22. 特願平06-235742 | 72. 特願平08-197050 |
| 23. 特願平06-238603 | 73. 特願平08-197051 |
| 24. 特願平06-244764 | 74. 特願平08-211946 |
| 25. 特願平06-248486 | 75. 特願平08-216506 |
| 26. 特願平06-252942 | 76. 特願平08-216508 |
| 27. 特願平06-268723 | 77. 特願平08-222352 |
| 28. 特願平06-293933 | 78. 特願平08-231066 |
| 29. 特願平06-301372 | 79. 特願平08-233442 |
| 30. 特願平06-323795 | 80. 特願平08-236685 |
| 31. 特願平06-324490 | 81. 特願平08-251410 |
| 32. 特願平06-507966 (不願2002-12420) | 82. 特願平08-262051 |
| 33. 特願平07-007185 | 83. 特願平08-302896 |
| 34. 特願平07-069255 | 84. 特願平08-308335 |
| 35. 特願平07-082880 | 85. 特願平08-308336 |
| 36. 特願平07-083142 | 86. 特願平08-311467 |
| 37. 特願平07-117933 | 87. 特願平08-315093 |
| 38. 特願平07-133487 | 88. 特願平08-317622 |
| 39. 特願平07-205141 | 89. 特願平08-320241 |
| 40. 特願平07-214659 | 90. 特願平08-506395 |
| 41. 特願平07-217276 | 91. 特願平09-002295 |
| 42. 特願平07-236185 | 92. 特願平09-010602 |
| 43. 特願平07-240684 | 93. 特願平09-019968 |
| 44. 特願平07-249244 | 94. 特願平09-019969 |
| 45. 特願平07-259922 | 95. 特願平09-019971 |
| 46. 特願平07-282716 | 96. 特願平09-024890 |
| 47. 特願平07-302793 | 97. 特願平09-028982 |
| 48. 特願平07-306004 | 98. 特願平09-046824 |
| 49. 特願平07-311711 | 99. 特願平09-049254 |
| 50. 特願平07-311715 | 100. 特願平09-053478 |

目録(2)

- | | |
|-------------------|-------------------|
| 101. 特願平09-054595 | 151. 特願平10-045434 |
| 102. 特願平09-056654 | 152. 特願平10-049499 |
| 103. 特願平09-057342 | 153. 特願平10-049867 |
| 104. 特願平09-058774 | 154. 特願平10-051489 |
| 105. 特願平09-067611 | 155. 特願平10-051490 |
| 106. 特願平09-074394 | 156. 特願平10-051491 |
| 107. 特願平09-080480 | 157. 特願平10-051492 |
| 108. 特願平09-082965 | 158. 特願平10-051493 |
| 109. 特願平09-091523 | 159. 特願平10-080740 |
| 110. 特願平09-091591 | 160. 特願平10-060741 |
| 111. 特願平09-091694 | 161. 特願平10-061895 |
| 112. 特願平09-098968 | 162. 特願平10-076139 |
| 113. 特願平09-099061 | 163. 特願平10-085207 |
| 114. 特願平09-099109 | 164. 特願平10-085208 |
| 115. 特願平09-104093 | 165. 特願平10-103083 |
| 116. 特願平09-119730 | 166. 特願平10-103115 |
| 117. 特願平09-129068 | 167. 特願平10-103671 |
| 118. 特願平09-134525 | 168. 特願平10-104093 |
| 119. 特願平09-147964 | 169. 特願平10-113493 |
| 120. 特願平09-155364 | 170. 特願平10-116378 |
| 121. 特願平09-159963 | 171. 特願平10-121456 |
| 122. 特願平09-163630 | 172. 特願平10-127520 |
| 123. 特願平09-163631 | 173. 特願平10-136198 |
| 124. 特願平09-171924 | 174. 特願平10-149603 |
| 125. 特願平09-175896 | 175. 特願平10-150494 |
| 126. 特願平09-180423 | 176. 特願平10-151245 |
| 127. 特願平09-188436 | 177. 特願平10-155838 |
| 128. 特願平09-198201 | 178. 特願平10-155841 |
| 129. 特願平09-208866 | 179. 特願平10-156104 |
| 130. 特願平09-221067 | 180. 特願平10-156108 |
| 131. 特願平09-228345 | 181. 特願平10-198313 |
| 132. 特願平09-230870 | 182. 特願平10-200280 |
| 133. 特願平09-253740 | 183. 特願平10-217132 |
| 134. 特願平09-256795 | 184. 特願平10-217180 |
| 135. 特願平09-271782 | 185. 特願平10-222837 |
| 136. 特願平09-291995 | 186. 特願平10-227939 |
| 137. 特願平09-297084 | 187. 特願平10-229591 |
| 138. 特願平09-307627 | 188. 特願平10-232520 |
| 139. 特願平09-308597 | 189. 特願平10-232590 |
| 140. 特願平09-309848 | 190. 特願平10-236009 |
| 141. 特願平09-327140 | 191. 特願平10-237485 |
| 142. 特願平09-327609 | 192. 特願平10-238144 |
| 143. 特願平09-328742 | 193. 特願平10-245293 |
| 144. 特願平09-360327 | 194. 特願平10-250598 |
| 145. 特願平10-002030 | 195. 特願平10-250611 |
| 146. 特願平10-010471 | 196. 特願平10-252128 |
| 147. 特願平10-014152 | 197. 特願平10-260347 |
| 148. 特願平10-015690 | 198. 特願平10-260416 |
| 149. 特願平10-024892 | 199. 特願平10-268791 |
| 150. 特願平10-043335 | 200. 特願平10-269859 |

目録(3)

- | | |
|-------------------|--------------------|
| 201. 特願平10-272529 | 251. 特願平11-135137 |
| 202. 特願平10-280351 | 252. 特願平11-135482 |
| 203. 特願平10-308533 | 253. 特願平11-143429 |
| 204. 特願平10-309765 | 254. 特願平11-144005 |
| 205. 特願平10-311673 | 255. 特願平11-147097 |
| 206. 特願平10-311674 | 256. 特願平11-151099 |
| 207. 特願平10-311675 | 257. 特願平11-166247 |
| 208. 特願平10-314856 | 258. 特願平11-173839 |
| 209. 特願平10-315751 | 259. 特願平11-179278 |
| 210. 特願平10-338896 | 260. 特願平11-186052 |
| 211. 特願平10-338897 | 261. 特願平11-193235 |
| 212. 特願平10-338898 | 262. 特願平11-224269 |
| 213. 特願平10-338899 | 263. 特願平11-225060 |
| 214. 特願平10-352428 | 264. 特願平11-225832 |
| 215. 特願平10-354665 | 265. 特願平11-225839 |
| 216. 特願平10-363297 | 266. 特願平11-226176 |
| 217. 特願平10-363329 | 267. 特願平11-234800 |
| 218. 特願平10-506788 | 268. 特願平11-240325 |
| 219. 特願平10-532832 | 269. 特願平11-240910 |
| 220. 特願平10-535583 | 270. 特願平11-241737 |
| 221. 特願平11-008183 | 271. 特願平11-242438 |
| 222. 特願平11-013380 | 272. 特願平11-242490 |
| 223. 特願平11-015176 | 273. 特願平11-253851 |
| 224. 特願平11-031724 | 274. 特願平11-260947 |
| 225. 特願平11-035776 | 275. 特願平11-277759 |
| 226. 特願平11-046372 | 276. 特願平11-278976 |
| 227. 特願平11-055835 | 277. 特願平11-279324 |
| 228. 特願平11-055867 | 278. 特願平11-281632 |
| 229. 特願平11-055930 | 279. 特願平11-303976 |
| 230. 特願平11-056957 | 280. 特願平11-309616 |
| 231. 特願平11-057381 | 281. 特願平11-315036 |
| 232. 特願平11-057749 | 282. 特願平11-321282 |
| 233. 特願平11-058103 | 283. 特願平11-336079 |
| 234. 特願平11-061079 | 284. 特願平11-346467 |
| 235. 特願平11-061080 | 285. 特願平11-354563 |
| 236. 特願平11-064193 | 286. 特願平11-360274 |
| 237. 特願平11-064372 | 287. 特願平11-365899 |
| 238. 特願平11-064506 | 288. 特願平11-373483 |
| 239. 特願平11-065136 | 289. 特願平11-510791 |
| 240. 特願平11-074385 | 290. 特願平11-515324 |
| 241. 特願平11-081225 | 291. 特願2000-001783 |
| 242. 特願平11-090383 | 292. 特願2000-005221 |
| 243. 特願平11-091875 | 293. 特願2000-009363 |
| 244. 特願平11-103231 | 294. 特願2000-010516 |
| 245. 特願平11-104509 | 295. 特願2000-011147 |
| 246. 特願平11-106920 | 296. 特願2000-011623 |
| 247. 特願平11-124187 | 297. 特願2000-016518 |
| 248. 特願平11-130771 | 298. 特願2000-016622 |
| 249. 特願平11-130814 | 299. 特願2000-017112 |
| 250. 特願平11-130815 | 300. 特願2000-018612 |

目録(4)

- | | |
|---------------------|---------------------|
| 301. 特願 2000-019195 | 351. 特願 2000-141763 |
| 302. 特願 2000-019528 | 352. 特願 2000-148843 |
| 303. 特願 2000-020067 | 353. 特願 2000-152455 |
| 304. 特願 2000-030321 | 354. 特願 2000-152469 |
| 305. 特願 2000-034109 | 355. 特願 2000-154484 |
| 306. 特願 2000-039082 | 356. 特願 2000-161895 |
| 307. 特願 2000-040355 | 357. 特願 2000-163122 |
| 308. 特願 2000-041927 | 358. 特願 2000-164584 |
| 309. 特願 2000-041929 | 359. 特願 2000-179723 |
| 310. 特願 2000-045318 | 360. 特願 2000-181281 |
| 311. 特願 2000-045855 | 361. 特願 2000-184259 |
| 312. 特願 2000-051488 | 362. 特願 2000-184295 |
| 313. 特願 2000-051650 | 363. 特願 2000-191007 |
| 314. 特願 2000-052040 | 364. 特願 2000-191265 |
| 315. 特願 2000-053707 | 365. 特願 2000-192332 |
| 316. 特願 2000-054949 | 366. 特願 2000-193817 |
| 317. 特願 2000-056093 | 367. 特願 2000-195384 |
| 318. 特願 2000-056879 | 368. 特願 2000-196991 |
| 319. 特願 2000-057584 | 369. 特願 2000-197022 |
| 320. 特願 2000-057565 | 370. 特願 2000-202801 |
| 321. 特願 2000-057566 | 371. 特願 2000-216457 |
| 322. 特願 2000-058133 | 372. 特願 2000-223714 |
| 323. 特願 2000-058282 | 373. 特願 2000-224970 |
| 324. 特願 2000-062316 | 374. 特願 2000-225486 |
| 325. 特願 2000-064142 | 375. 特願 2000-225864 |
| 326. 特願 2000-064209 | 376. 特願 2000-225978 |
| 327. 特願 2000-071119 | 377. 特願 2000-226361 |
| 328. 特願 2000-076122 | 378. 特願 2000-229191 |
| 329. 特願 2000-085874 | 379. 特願 2000-230551 |
| 330. 特願 2000-089078 | 380. 特願 2000-237165 |
| 331. 特願 2000-092693 | 381. 特願 2000-237166 |
| 332. 特願 2000-100395 | 382. 特願 2000-237533 |
| 333. 特願 2000-105139 | 383. 特願 2000-246309 |
| 334. 特願 2000-105917 | 384. 特願 2000-248331 |
| 335. 特願 2000-107160 | 385. 特願 2000-249232 |
| 336. 特願 2000-108409 | 386. 特願 2000-256149 |
| 337. 特願 2000-109638 | 387. 特願 2000-257080 |
| 338. 特願 2000-109954 | 388. 特願 2000-257083 |
| 339. 特願 2000-118361 | 389. 特願 2000-260030 |
| 340. 特願 2000-120874 | 390. 特願 2000-261233 |
| 341. 特願 2000-123634 | 391. 特願 2000-264743 |
| 342. 特願 2000-128431 | 392. 特願 2000-265344 |
| 343. 特願 2000-131049 | 393. 特願 2000-278502 |
| 344. 特願 2000-131050 | 394. 特願 2000-279557 |
| 345. 特願 2000-131745 | 395. 特願 2000-292422 |
| 346. 特願 2000-134427 | 396. 特願 2000-292832 |
| 347. 特願 2000-136551 | 397. 特願 2000-299812 |
| 348. 特願 2000-136572 | 398. 特願 2000-307464 |
| 349. 特願 2000-138977 | 399. 特願 2000-308248 |
| 350. 特願 2000-141566 | 400. 特願 2000-309581 |

目録(5)

- | | |
|--------------------|--------------------|
| 401. 特願2000-319775 | 451. 特願2001-071435 |
| 402. 特願2000-322056 | 452. 特願2001-072650 |
| 403. 特願2000-333311 | 453. 特願2001-072668 |
| 404. 特願2000-334686 | 454. 特願2001-072963 |
| 405. 特願2000-334969 | 455. 特願2001-073028 |
| 406. 特願2000-343912 | 456. 特願2001-074964 |
| 407. 特願2000-347398 | 457. 特願2001-074965 |
| 408. 特願2000-347865 | 458. 特願2001-077257 |
| 409. 特願2000-358121 | 459. 特願2001-078671 |
| 410. 特願2000-368566 | 460. 特願2001-084173 |
| 411. 特願2000-374626 | 461. 特願2001-089541 |
| 412. 特願2000-375090 | 462. 特願2001-091911 |
| 413. 特願2000-378421 | 463. 特願2001-092337 |
| 414. 特願2000-378942 | 464. 特願2001-116171 |
| 415. 特願2000-378950 | 465. 特願2001-124294 |
| 416. 特願2000-384771 | 466. 特願2001-124452 |
| 417. 特願2000-387016 | 467. 特願2001-127575 |
| 418. 特願2000-394815 | 468. 特願2001-127576 |
| 419. 特願2000-396445 | 469. 特願2001-135357 |
| 420. 特願2000-399940 | 470. 特願2001-137087 |
| 421. 特願2000-400336 | 471. 特願2001-138103 |
| 422. 特願2000-401110 | 472. 特願2001-142583 |
| 423. 特願2000-401245 | 473. 特願2001-147081 |
| 424. 特願2000-401258 | 474. 特願2001-152364 |
| 425. 特願2000-503838 | 475. 特願2001-152379 |
| 426. 特願2000-571733 | 476. 特願2001-153447 |
| 427. 特願2000-571943 | 477. 特願2001-155672 |
| 428. 特願2000-602588 | 478. 特願2001-163740 |
| 429. 特願2000-602900 | 479. 特願2001-164819 |
| 430. 特願2000-618709 | 480. 特願2001-164997 |
| 431. 特願2001-003476 | 481. 特願2001-165133 |
| 432. 特願2001-005615 | 482. 特願2001-167910 |
| 433. 特願2001-007979 | 483. 特願2001-168784 |
| 434. 特願2001-016626 | 484. 特願2001-171705 |
| 435. 特願2001-025030 | 485. 特願2001-173331 |
| 436. 特願2001-037141 | 486. 特願2001-174421 |
| 437. 特願2001-037147 | 487. 特願2001-174553 |
| 438. 特願2001-042501 | 488. 特願2001-175898 |
| 439. 特願2001-044933 | 489. 特願2001-178169 |
| 440. 特願2001-047762 | 490. 特願2001-179858 |
| 441. 特願2001-050645 | 491. 特願2001-180552 |
| 442. 特願2001-053550 | 492. 特願2001-180554 |
| 443. 特願2001-054717 | 493. 特願2001-187735 |
| 444. 特願2001-059115 | 494. 特願2001-197185 |
| 445. 特願2001-059892 | 495. 特願2001-197897 |
| 446. 特願2001-060848 | 496. 特願2001-200854 |
| 447. 特願2001-062703 | 497. 特願2001-201356 |
| 448. 特願2001-065799 | 498. 特願2001-202971 |
| 449. 特願2001-065917 | 499. 特願2001-203089 |
| 450. 特願2001-068285 | 500. 特願2001-206505 |

目録(6)

- | | |
|--------------------|--------------------|
| 501. 特願2001-206522 | 551. 特願2001-325367 |
| 502. 特願2001-206523 | 552. 特願2001-326872 |
| 503. 特願2001-209305 | 553. 特願2001-327853 |
| 504. 特願2001-212947 | 554. 特願2001-329023 |
| 505. 特願2001-216505 | 555. 特願2001-332168 |
| 506. 特願2001-220219 | 556. 特願2001-337467 |
| 507. 特願2001-226176 | 557. 特願2001-339396 |
| 508. 特願2001-228287 | 558. 特願2001-339593 |
| 509. 特願2001-228374 | 559. 特願2001-346035 |
| 510. 特願2001-235412 | 560. 特願2001-347316 |
| 511. 特願2001-235747 | 561. 特願2001-347637 |
| 512. 特願2001-238951 | 562. 特願2001-349614 |
| 513. 特願2001-241023 | 563. 特願2001-351730 |
| 514. 特願2001-243930 | 564. 特願2001-352189 |
| 515. 特願2001-246642 | 565. 特願2001-353038 |
| 516. 特願2001-249976 | 566. 特願2001-358446 |
| 517. 特願2001-254377 | 567. 特願2001-358581 |
| 518. 特願2001-254378 | 568. 特願2001-359710 |
| 519. 特願2001-255589 | 569. 特願2001-374928 |
| 520. 特願2001-256576 | 570. 特願2001-376591 |
| 521. 特願2001-257188 | 571. 特願2001-378757 |
| 522. 特願2001-261158 | 572. 特願2001-380473 |
| 523. 特願2001-266004 | 573. 特願2001-382537 |
| 524. 特願2001-266069 | 574. 特願2001-382539 |
| 525. 特願2001-266454 | 575. 特願2001-382599 |
| 526. 特願2001-267194 | 576. 特願2001-385258 |
| 527. 特願2001-267379 | 577. 特願2001-385512 |
| 528. 特願2001-267863 | 578. 特願2001-385513 |
| 529. 特願2001-272977 | 579. 特願2001-385538 |
| 530. 特願2001-273964 | 580. 特願2001-388116 |
| 531. 特願2001-276053 | 581. 特願2001-390122 |
| 532. 特願2001-279406 | 582. 特願2001-392087 |
| 533. 特願2001-280319 | 583. 特願2001-392088 |
| 534. 特願2001-285145 | 584. 特願2001-395196 |
| 535. 特願2001-291059 | 585. 特願2001-396120 |
| 536. 特願2001-292223 | 586. 特願2001-397762 |
| 537. 特願2001-292224 | 587. 特願2001-397998 |
| 538. 特願2001-293000 | 588. 特願2001-401139 |
| 539. 特願2001-293054 | 589. 特願2001-515803 |
| 540. 特願2001-293936 | 590. 特願2001-523852 |
| 541. 特願2001-294013 | 591. 特願2001-557672 |
| 542. 特願2001-298140 | 592. 特願2002-000993 |
| 543. 特願2001-298402 | 593. 特願2002-005746 |
| 544. 特願2001-307340 | 594. 特願2002-010344 |
| 545. 特願2001-309501 | 595. 特願2002-011558 |
| 546. 特願2001-309508 | 596. 特願2002-019752 |
| 547. 特願2001-309984 | 597. 特願2002-020329 |
| 548. 特願2001-310554 | 598. 特願2002-022499 |
| 549. 特願2001-313430 | 599. 特願2002-028046 |
| 550. 特願2001-319360 | 600. 特願2002-028109 |

目録(7)

- | | |
|---------------------|--------------------|
| 601. 特願2002-040151 | 651. 特願2002-162157 |
| 602. 特願2002-042829 | 652. 特願2002-162211 |
| 603. 特願2002-044340 | 653. 特願2002-162365 |
| 604. 特願2002-044640 | 654. 特願2002-167759 |
| 605. 特願2002-046188 | 655. 特願2002-170068 |
| 606. 特願2002-047799 | 656. 特願2002-170902 |
| 607. 特願2002-053190 | 657. 特願2002-176435 |
| 608. 特願2002-053575 | 658. 特願2002-176583 |
| 609. 特願2002-055272 | 659. 特願2002-183722 |
| 610. 特願2002-057253 | 660. 特願2002-185966 |
| 611. 特願2002-057565 | 661. 特願2002-187362 |
| 612. 特願2002-057935 | 662. 特願2002-187957 |
| 613. 特願2002-057963 | 663. 特願2002-188281 |
| 614. 特願2002-066249 | 664. 特願2002-189265 |
| 615. 特願2002-070624 | 665. 特願2002-194627 |
| 616. 特願2002-070987 | 666. 特願2002-197812 |
| 617. 特願2002-071924 | 667. 特願2002-201443 |
| 618. 特願2002-074902 | 668. 特願2002-201575 |
| 619. 特願2002-078164 | 669. 特願2002-202118 |
| 620. 特願2002-081467 | 670. 特願2002-205814 |
| 621. 特願2002-081502 | 671. 特願2002-205825 |
| 622. 特願2002-083081 | 672. 特願2002-217714 |
| 623. 特願2002-084139 | 673. 特願2002-221188 |
| 624. 特願2002-085017 | 674. 特願2002-225469 |
| 625. 特願2002-087342 | 675. 特願2002-225724 |
| 626. 特願2002-094681 | 676. 特願2002-226859 |
| 627. 特願2002-095132 | 677. 特願2002-227286 |
| 628. 特願2002-095389 | 678. 特願2002-229686 |
| 629. 特願2002-100431 | 679. 特願2002-230562 |
| 630. 特願2002-106561 | 680. 特願2002-235294 |
| 631. 特願2002-1119320 | 681. 特願2002-235737 |
| 632. 特願2002-120371 | 682. 特願2002-236838 |
| 633. 特願2002-123347 | 683. 特願2002-237058 |
| 634. 特願2002-128854 | 684. 特願2002-237092 |
| 635. 特願2002-133717 | 685. 特願2002-248946 |
| 636. 特願2002-133749 | 686. 特願2002-253322 |
| 637. 特願2002-134313 | 687. 特願2002-253689 |
| 638. 特願2002-141187 | 688. 特願2002-253697 |
| 639. 特願2002-141438 | 689. 特願2002-254096 |
| 640. 特願2002-142260 | 690. 特願2002-257924 |
| 641. 特願2002-149471 | 691. 特願2002-260788 |
| 642. 特願2002-149931 | 692. 特願2002-261499 |
| 643. 特願2002-150541 | 693. 特願2002-264969 |
| 644. 特願2002-154688 | 694. 特願2002-267114 |
| 645. 特願2002-154695 | 695. 特願2002-268987 |
| 646. 特願2002-154823 | 696. 特願2002-270917 |
| 647. 特願2002-158237 | 697. 特願2002-271375 |
| 648. 特願2002-158352 | 698. 特願2002-271473 |
| 649. 特願2002-160277 | 699. 特願2002-273996 |
| 650. 特願2002-162148 | 700. 特願2002-274469 |

目録(8)

- | | |
|---------------------|---------------------|
| 701. 特願 2002-276051 | 751. 特願 2003-012738 |
| 702. 特願 2002-282746 | 752. 特願 2003-012774 |
| 703. 特願 2002-286487 | 753. 特願 2003-015968 |
| 704. 特願 2002-289209 | 754. 特願 2003-016044 |
| 705. 特願 2002-295332 | 755. 特願 2003-016940 |
| 706. 特願 2002-296911 | 756. 特願 2003-017397 |
| 707. 特願 2002-299429 | 757. 特願 2003-021499 |
| 708. 特願 2002-301875 | 758. 特願 2003-024347 |
| 709. 特願 2002-303838 | 759. 特願 2003-024620 |
| 710. 特願 2002-312131 | 760. 特願 2003-025277 |
| 711. 特願 2002-320102 | 761. 特願 2003-027647 |
| 712. 特願 2002-320704 | 762. 特願 2003-027648 |
| 713. 特願 2002-325909 | 763. 特願 2003-031882 |
| 714. 特願 2002-325920 | 764. 特願 2003-032932 |
| 715. 特願 2002-332232 | 765. 特願 2003-038206 |
| 716. 特願 2002-339344 | 766. 特願 2003-040642 |
| 717. 特願 2002-339392 | 767. 特願 2003-043961 |
| 718. 特願 2002-339541 | 768. 特願 2003-050153 |
| 719. 特願 2002-339551 | 769. 特願 2003-050446 |
| 720. 特願 2002-341195 | 770. 特願 2003-052520 |
| 721. 特願 2002-343807 | 771. 特願 2003-052602 |
| 722. 特願 2002-344279 | 772. 特願 2003-052613 |
| 723. 特願 2002-345597 | 773. 特願 2003-052877 |
| 724. 特願 2002-347401 | 774. 特願 2003-053023 |
| 725. 特願 2002-348760 | 775. 特願 2003-054182 |
| 726. 特願 2002-349042 | 776. 特願 2003-054798 |
| 727. 特願 2002-354594 | 777. 特願 2003-054799 |
| 728. 特願 2002-357768 | 778. 特願 2003-054846 |
| 729. 特願 2002-357900 | 779. 特願 2003-054847 |
| 730. 特願 2002-358019 | 780. 特願 2003-054848 |
| 731. 特願 2002-358967 | 781. 特願 2003-054849 |
| 732. 特願 2002-360972 | 782. 特願 2003-055452 |
| 733. 特願 2002-360975 | 783. 特願 2003-056628 |
| 734. 特願 2002-368112 | 784. 特願 2003-061426 |
| 735. 特願 2002-376555 | 785. 特願 2003-063532 |
| 736. 特願 2002-376774 | 786. 特願 2003-065013 |
| 737. 特願 2002-376831 | 787. 特願 2003-071028 |
| 738. 特願 2002-379214 | 788. 特願 2003-072979 |
| 739. 特願 2002-380624 | 789. 特願 2003-074168 |
| 740. 特願 2002-381888 | 790. 特願 2003-076107 |
| 741. 特願 2002-382170 | 791. 特願 2003-078999 |
| 742. 特願 2002-383870 | 792. 特願 2003-079598 |
| 743. 特願 2002-521644 | 793. 特願 2003-079613 |
| 744. 特願 2002-532458 | 794. 特願 2003-082466 |
| 745. 特願 2002-546564 | 795. 特願 2003-083318 |
| 746. 特願 2002-548185 | 796. 特願 2003-083433 |
| 747. 特願 2002-570743 | 797. 特願 2003-083480 |
| 748. 特願 2003-003450 | 798. 特願 2003-085193 |
| 749. 特願 2003-012550 | 799. 特願 2003-089026 |
| 750. 特願 2003-012694 | 800. 特願 2003-090331 |

目録(9)

- | | |
|--------------------|--------------------|
| 801. 特願2003-091446 | 851. 特願2003-127135 |
| 802. 特願2003-092654 | 852. 特願2003-127150 |
| 803. 特願2003-093642 | 853. 特願2003-128818 |
| 804. 特願2003-094272 | 854. 特願2003-128897 |
| 805. 特願2003-094719 | 855. 特願2003-129347 |
| 806. 特願2003-095770 | 856. 特願2003-131313 |
| 807. 特願2003-095884 | 857. 特願2003-132280 |
| 808. 特願2003-095885 | 858. 特願2003-132605 |
| 809. 特願2003-095886 | 859. 特願2003-132606 |
| 810. 特願2003-095904 | 860. 特願2003-135591 |
| 811. 特願2003-097283 | 861. 特願2003-136445 |
| 812. 特願2003-097327 | 862. 特願2003-139397 |
| 813. 特願2003-101917 | 863. 特願2003-140684 |
| 814. 特願2003-104928 | 864. 特願2003-142303 |
| 815. 特願2003-105362 | 865. 特願2003-143932 |
| 816. 特願2003-107267 | 866. 特願2003-145221 |
| 817. 特願2003-107268 | 867. 特願2003-145390 |
| 818. 特願2003-107647 | 868. 特願2003-147820 |
| 819. 特願2003-107885 | 869. 特願2003-150690 |
| 820. 特願2003-109575 | 870. 特願2003-153014 |
| 821. 特願2003-115750 | 871. 特願2003-153015 |
| 822. 特願2003-115793 | 872. 特願2003-153016 |
| 823. 特願2003-115847 | 873. 特願2003-153985 |
| 824. 特願2003-115888 | 874. 特願2003-154009 |
| 825. 特願2003-116232 | 875. 特願2003-154841 |
| 826. 特願2003-116895 | 876. 特願2003-155397 |
| 827. 特願2003-118161 | 877. 特願2003-155407 |
| 828. 特願2003-118186 | 878. 特願2003-158017 |
| 829. 特願2003-119749 | 879. 特願2003-161005 |
| 830. 特願2003-119930 | 880. 特願2003-164126 |
| 831. 特願2003-120934 | 881. 特願2003-170051 |
| 832. 特願2003-121233 | 882. 特願2003-170324 |
| 833. 特願2003-121261 | 883. 特願2003-170325 |
| 834. 特願2003-121273 | 884. 特願2003-170326 |
| 835. 特願2003-121780 | 885. 特願2003-170327 |
| 836. 特願2003-122245 | 886. 特願2003-170328 |
| 837. 特願2003-123984 | 887. 特願2003-170329 |
| 838. 特願2003-124654 | 888. 特願2003-170330 |
| 839. 特願2003-124655 | 889. 特願2003-170573 |
| 840. 特願2003-124826 | 890. 特願2003-171576 |
| 841. 特願2003-124829 | 891. 特願2003-171619 |
| 842. 特願2003-124833 | 892. 特願2003-172898 |
| 843. 特願2003-124835 | 893. 特願2003-175819 |
| 844. 特願2003-125388 | 894. 特願2003-177298 |
| 845. 特願2003-125403 | 895. 特願2003-180198 |
| 846. 特願2003-125405 | 896. 特願2003-182958 |
| 847. 特願2003-127090 | 897. 特願2003-192763 |
| 848. 特願2003-127093 | 898. 特願2003-192775 |
| 849. 特願2003-127109 | 899. 特願2003-194837 |
| 850. 特願2003-127130 | 900. 特願2003-197229 |

目 録 (10)

- | | |
|---------------------|---------------------|
| 901. 特願 2003-198340 | 951. 特願 2003-338191 |
| 902. 特願 2003-204075 | 952. 特願 2003-339542 |
| 903. 特願 2003-205349 | 953. 特願 2003-340181 |
| 904. 特願 2003-205710 | 954. 特願 2003-342519 |
| 905. 特願 2003-206546 | |
| 906. 特願 2003-207698 | |
| 907. 特願 2003-207771 | |
| 908. 特願 2003-207772 | |
| 909. 特願 2003-207850 | |
| 910. 特願 2003-270049 | |
| 911. 特願 2003-271473 | |
| 912. 特願 2003-272421 | |
| 913. 特願 2003-275055 | |
| 914. 特願 2003-277958 | |
| 915. 特願 2003-279130 | |
| 916. 特願 2003-283972 | |
| 917. 特願 2003-284055 | |
| 918. 特願 2003-286640 | |
| 919. 特願 2003-289138 | |
| 920. 特願 2003-293912 | |
| 921. 特願 2003-296474 | |
| 922. 特願 2003-298558 | |
| 923. 特願 2003-299424 | |
| 924. 特願 2003-303979 | |
| 925. 特願 2003-304452 | |
| 926. 特願 2003-304453 | |
| 927. 特願 2003-305689 | |
| 928. 特願 2003-305844 | |
| 929. 特願 2003-306137 | |
| 930. 特願 2003-307564 | |
| 931. 特願 2003-313014 | |
| 932. 特願 2003-315355 | |
| 933. 特願 2003-318801 | |
| 934. 特願 2003-321497 | |
| 935. 特願 2003-322948 | |
| 936. 特願 2003-324974 | |
| 937. 特願 2003-326510 | |
| 938. 特願 2003-327645 | |
| 939. 特願 2003-327907 | |
| 940. 特願 2003-328600 | |
| 941. 特願 2003-328840 | |
| 942. 特願 2003-330418 | |
| 943. 特願 2003-330569 | |
| 944. 特願 2003-331848 | |
| 945. 特願 2003-332756 | |
| 946. 特願 2003-333798 | |
| 947. 特願 2003-333932 | |
| 948. 特願 2003-334036 | |
| 949. 特願 2003-334083 | |
| 950. 特願 2003-336365 | |

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-116895
受付番号	20308550819
書類名	出願人名義変更届 (一般承継)
担当官	鎌田 証規 8045
作成日	平成16年 3月29日

<認定情報・付加情報>

【提出された物件の記事】

【提出物件名】	委任状 (代理権を証明する書面)	1
---------	------------------	---

特願 2003-116895

出願人履歴情報

識別番号

[000006792]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住所

埼玉県和光市広沢2番1号

氏名

理化学研究所

特願 2003-116895

出願人履歴情報

識別番号

[591063394]

1. 変更年月日

2001年10月 9日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都新宿区西新宿二丁目8番1号

氏 名

財団法人 東京都医学研究機構

特願 2003-116895

出願人履歴情報

識別番号

[503359821]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

2003年10月 1日

新規登録

埼玉県和光市広沢2番1号

独立行政法人理化学研究所

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**